

Aus der Abteilung Hygiene der Milch, Fische und Eier
am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Vorsteher: Professor Dr. G. Kielwein

**Untersuchungen über die Anwendung
einiger Nachweismethoden zur Feststellung
von Antibiotika in Milch**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Hans-Jürgen Brunn
Tierarzt aus Mainz/Rh.

Gießen 1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545914_0056

Aus der Abteilung Hygiene der Milch, Fische und Eier
am Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Vorsteher: Professor Dr. G. Kielwein

**Untersuchungen über die Anwendung
einiger Nachweismethoden zur Feststellung
von Antibiotika in Milch**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Hans-Jürgen Brunn
Tierarzt aus Mainz/Rh.

Gießen 1971

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät in Gießen

Dekan: Professor Dr. G. Lämmler

Berichterstatter: Professor Dr. G. Kielwein

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Juli 1971



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
1. <u>E i n l e i t u n g</u>	6
2. <u>L i t e r a t u r</u>	9
2.1. <u>Antibiotika unter besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung bei Milchtieren</u>	9
2.1.1. Allgemeines	9
2.1.1.1. Penicillin	9
2.1.1.2. Streptomycin und Dihydrostreptomycin	11
2.1.1.3. Neomycin	12
2.1.1.4. Kanamycin	13
2.1.1.5. Chloramphenicol	14
2.1.1.6. Tetracycline	15
2.1.1.7. Spiramycin	16
2.1.2. Die allgemeine therapeutische Anwendung von Antibiotika bei Milchtieren	17
2.1.3. Die spezielle Anwendung von Antibiotika bei der Mastitistherapie der Milchtiere	18
2.1.4. Die nutritive Anwendung von Antibiotika bei Tieren	18
2.2. <u>Die Ausscheidung der Antibiotika über die Milch</u>	19
2.2.1. Die Ausscheidung nach parenteraler Anwendung	19
2.2.2. Die Ausscheidung nach intramammärer Anwendung	23
2.2.3. Die Ausscheidung nach nutritiver Anwendung	25
2.3. <u>Die Bedeutung Antibiotika-haltiger Milch beim Verzehr durch Menschen und für die Molkerei- wirtschaft</u>	25
2.3.1. Die Auswirkungen Antibiotika-haltiger Milch auf den Verbraucher	25
2.3.2. Die Auswirkungen Antibiotika-haltiger Milch auf die molkereiwirtschaftliche Technologie	27
2.4. <u>Der Nachweis von Antibiotika in Milch</u>	29
2.4.1. Chemische Nachweismethoden	29
2.4.2. Mikrobiologische Nachweismethoden	30
2.4.3. Literaturangaben zum Vorkommen von Antibiotika in Milch	34

2.5.	<u>Die Beeinflussung der Hemmstoffwirkung von Antibiotika durch eine Erhitzung</u>	35
2.6.	<u>Die Bedeutung sonstiger Hemmstoffe in der Milch</u>	37
3.	<u>E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n</u>	39
3.1.	<u>Material und Methoden</u>	39
3.1.1.	<u>Material</u>	39
3.1.1.1.	Verwendete Kulturen	39
3.1.1.2.	Milch	39
3.1.1.3.	Nährmedien	39
3.1.1.4.	Indikatoren und Reagentien	40
3.1.1.5.	Antibiotika	40
3.1.2.	<u>Methoden</u>	42
3.1.2.1.	Keimzahlbestimmung	42
3.1.2.2.	Die Erhitzung der Milchproben zur Inaktivierung des Keimgehaltes	42
3.1.2.3.	Die Anwendung des Methylenblau-Reduktions- testes zur Bestimmung der Wachstumsintensität von Joghurtkultur	43
3.1.2.4.	Hemmstoffproben	43
3.1.2.4.1.	Joghurt-Test	43
3.1.2.4.2.	Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)- Reduktionstest	44
3.1.2.4.3.	Agardiffusionstest	45
3.1.2.5.	Der Nachweis von Tetracyclinen durch Fluoreszenz-optische Methoden	47
3.1.2.6.	Die Inaktivierung von Penicillin mittels Penicillinase	48
3.2.	<u>Ergebnisse</u>	49
3.2.1.	<u>Die Bedeutung der Milcherhitzung vor der Durchführung von Hemmstoffproben</u>	49
3.2.1.1.	Reduktion des Keimgehaltes durch Vorer- hitzung der Rohmilch	49
3.2.1.2.	Die Inaktivierung der Milch-eigenen Hemmstoffe	52

	Seite
3.2.1.2.1. Die Auswirkung des Zusatzes von er- hitzter Milch zu Rohmilch auf das Wachstum von Joghurtkultur	52
3.2.1.2.2. Die Bedeutung unterschiedlicher Vorer- hitzung der Milch für die Vermehrung von Joghurtkultur	53
3.2.1.3. Besprechung der Ergebnisse	54
3.2.2. Ermittlung der Nachweisgrenzen für Anti- biotika in Milch unter Verwendung ver- schiedener Nachweismethoden sowie der spezifische Nachweis von Antibiotika in Milch	55
3.2.2.1. Nachweis von Antibiotika-Reinsubstanzen	55
3.2.2.2. Nachweis von einigen gebräuchlichen Antibiotika-haltigen Mastitispräparaten	60
3.2.2.3. Spezifischer Nachweis von Antibiotika und Antibiotika-haltigen Mastitispräparaten	64
3.2.2.3.1. Der Nachweis von Tetracyclinen mittels Fluoreszenz	64
3.2.2.3.2. Der Nachweis von Penicillinen mittels Penicillinase	64
3.2.2.4. Besprechung der Ergebnisse	65
3.2.3. <u>Erprobung der Nachweismethoden für Anti- biotika unter Praxisbedingungen an Bestandsmilchproben</u>	67
3.2.3.1. Allgemeiner Hemmstoffnachweis	67
3.2.3.2. Spezifischer Hemmstoffnachweis	69
3.2.3.2.1. Der Nachweis von Tetracyclinen mittels Fluoreszenz	69
3.2.3.2.2. Der Nachweis von Penicillin mittels Penicillinase	69
3.2.3.3. Besprechung der Ergebnisse	70
3.3. <u>Zusammenfassende Besprechung der Ergeb- nisse und Schlußbetrachtung</u>	71
3.4. <u>Zusammenfassung</u>	76
4. <u>L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s</u>	77

1. E i n l e i t u n g

Antibiotika gehören zu den Arzneimitteln, die am häufigsten an Nutztiere verabfolgt werden. Sie werden entweder zur Therapie oder Prophylaxe bei infektiösen Erkrankungen eingesetzt oder wegen ihres nutritiven Effektes dem Futter zugefügt (48).

Nach Angaben des Bundesgesundheitsrates (106) werden derzeit 58 % der in der Welt hergestellten Antibiotika in der Tierernährung verbraucht. In den USA sind 1967 für 221 Millionen Dollar Antibiotika als Futtermittelzusätze umgesetzt worden (42). Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (77) werden allein 75 Tonnen Antibiotika pro Jahr bei der Mastitisbehandlung bei Milchkühen eingesetzt.

Die Einführung der Antibiotika zur Therapie infektiöser Erkrankungen bei Mensch und Tier ermöglicht der Human- und Veterinärmedizin eine weitgehende Beherrschung bakteriell bedingter Infektionskrankheiten, wenn auch die zu Beginn der Antibiotika-Ära gehegten optimistischen Hoffnungen nicht voll erfüllt worden sind. Die Antibiotika-Therapie ermöglicht der Medizin nicht nur die Lösung von therapeutischen Problemen, sondern sie stellt sie auch vor neue Schwierigkeiten.

Für die Humanmedizin kann nach vorsichtigen Schätzungen (21) davon ausgegangen werden, daß etwa 3 bis 5 % der mit Penicillin behandelten Patienten auf parenteral oder oral verabreichte Penicilline allergisch reagieren. Schwere anaphylaktische Schockerscheinungen sind bei etwa 0,2 bis 0,4 % der Behandelten zu verzeichnen. Aber auch durch die unbeabsichtigte und unkontrollierte Aufnahme unterschwelliger Dosen von Antibiotika über Nahrungsmittel ist eine Gefährdung sensibilisierter Menschen möglich. Hier kommt Lebensmitteln, die von mit Antibiotika behandelten Tieren stammen, besondere Bedeutung zu.

Um zu erreichen, daß der Verbraucher möglichst vor dieser Gefährdung bewahrt wird, ist es notwendig, daß Antibiotika

nur unter Einhaltung bestimmter Vorsichtsmaßnahmen Anwendung finden. In der Bundesrepublik Deutschland ist daher im § 28 (4) 2 des Arzneimittelgesetzes (76) festgelegt, daß Arzneimittel durch Tierärzte nur an Halter der von ihnen behandelten Tiere abgegeben und zu diesem Zwecke vorrätig gehalten werden dürfen.

Obwohl vom Gesetzgeber schon vor der Einführung der Antibiotika-Therapie formuliert, gibt die Anweisung des § 3 (1) g der 1. Verordnung zur Ausführung des Milchgesetzes (75) die rechtliche Handhabe, das Inverkehrbringen Antibiotika-haltiger Milch zu unterbinden. Entsprechend dieser Anweisung ist es verboten, Milch von Kühen zu gewinnen und in den Verkehr zu bringen, die mit in die Milch übergehenden Arzneimitteln behandelt werden oder vor weniger als 5 Tagen behandelt worden sind.

Um den durch den Erlaß von Rechtsvorschriften angestrebten Erfolg sicherzustellen, muß vor allem dann, wenn eine ernsthafte Gefährdung der Gesundheit der Bevölkerung - wie etwa bei Inverkehrbringen Antibiotika-haltiger Milch - abgewehrt werden soll, deren Einhaltung durch laufende Überwachungsmaßnahmen kontrolliert werden.

Die Einhaltung der Vorschriften des § 3 der 1. Ausführungsverordnung zum Milchgesetz in Bezug auf Antibiotika kann dadurch überwacht werden, daß entweder durch staatliche Untersuchungsanstalten eine regelmäßige Untersuchung der Anlieferungsmilch auf Antibiotika-Gehalt erfolgt, oder daß die milchverarbeitende Wirtschaft oder von ihr beauftragte Organisationen (z.B. Milchkontrollverbände) zur laufenden Überwachung der angelieferten Milch verpflichtet werden. Die hierbei zur Anwendung kommenden Untersuchungsmethoden müssen aussagesicher und rationell sowie unter Praxisbedingungen anwendbar sein.

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war die Überprüfung einiger in der Literatur beschriebener Methoden zum Antibiotikanachweis in Milch. Hierbei sollte vor allem die Eignung dieser Methoden für den routinemäßigen Einsatz in der Milchwirtschaft bewertet werden.

2. L i t e r a t u r

2.1. Antibiotika unter besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung bei Milchtieren.

2.1.1. Allgemeines

Antibiotika sind chemisch definierte Stoffe biologischen Ursprungs, die - ohne Enzymcharakter zu besitzen - in geringen Konzentrationen Wachstumsvorgänge hemmen (3). Nur ein kleiner Teil der in der Natur vorkommenden Antibiotika ist therapeutisch verwertbar, da zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten nur solche Antibiotika verwendet werden können, die den Stoffwechsel lebender Körperzellen nicht oder nur wenig beeinflussen (25).

Antibiotika wirken bakterizid oder bakteriostatisch. Sie greifen entweder in den Stoffwechsel der Nukleinsäuren und Proteine oder in die Synthese der Bakterienwände ein. Hierbei weisen sie eine mehr oder weniger große Spezifität hinsichtlich der beeinflussbaren Zellen auf (25).

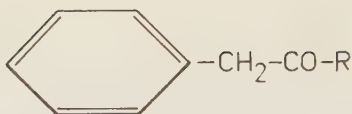
Zur Therapie bei Milchtieren sind die folgenden Antibiotika von Bedeutung: Penicillin, Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracycline, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Kanamycin, Spiramycin sowie Substanzen der Neomycingruppe. Antibiotika können untereinander oder mit Vitaminen, Chemotherapeutika, Furanderivaten oder Kortikosteroiden kombiniert sein (86).

In Anlehnung an die Angaben von WALTER und HEILMEYER (103) lassen sich die genannten Antibiotika wie folgt erläutern:

2.1.1.1. Penicillin

Penicillin wurde ursprünglich aus Penicillium notatum, später aus natürlichen und vor allem künstlichen Mutanten von Penicillium crysogenum gewonnen.

Penicillin G (Na-Salz) hat - wie 1949 festgestellt wurde - folgende Strukturformel:



Penicillin G

Die Summenformel lautet $C_{16} H_{17} N_2 NaOH_4 S$.

Penicillin wird in Form verschiedener Salze und neuerdings auch in halbsynthetischer Form hergestellt.

Der Wirkungsbereich der Penicilline umfaßt grampositive und gramnegative Kokken, zahlreiche grampositive Bakterien und Spirochäten. Gegenüber Salmonellen und Haemophilus wird nur bei sehr hoher Dosierung eine Wirkung beobachtet. Die antibiotische Wirkung des Penicillins setzt bereits nach 30 bis 60 Minuten ein. Sie ist bei proliferierenden Keimen bakteriostatisch. Bei höheren Konzentrationen aber tritt Bakterizidie auf. Das Penicillin G wird unter pH 4 und über pH 8 rasch inaktiviert. Im Organismus wird es zu 30 bis 50 % inaktiviert und wie die meisten Sulfonamide und Antibiotika an Serumeiweiß gebunden. Die zum größten Teil reversible Eiweißbindung bedingt eine Wirkungsminderung des Penicillins, deren Ausmaß der physikalisch feststellbaren Bindung an die Eiweißkörper im Serum oder Gewebe entspricht.

Penicillin wird durch das Enzym Penicillinase gespalten. Die Penicillinase ist ein primär intrazelluläres Enzym, das von Penicillin-resistenten Staphylokokken, aber auch von zahlreichen anderen Mikroorganismen, wie etwa Bacillus cereus und E. coli, gebildet wird. Die verschiedenen Penicillinasen sind in ihrer Reaktionsweise und -geschwindigkeit gegenüber Penicillinen nicht einheitlich.

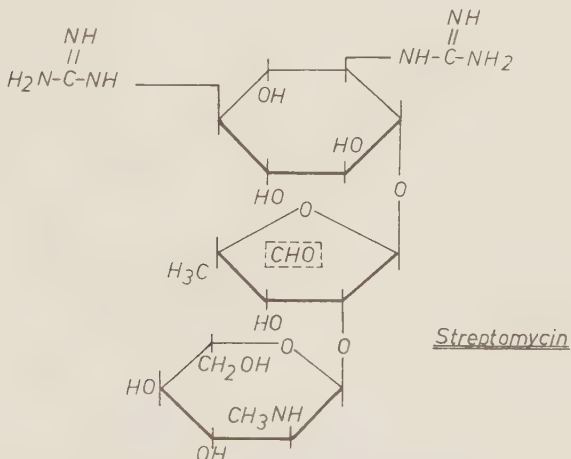
Das Procain-Penicillin G wurde 1948 als Depot-Penicillin eingeführt. Es gestattet - je nach Dosierung - eine über Tage ausreichende Depotwirkung vor allem bei Infektionen mit empfindlichen Keimen. Bei schwer beeinflussbaren ist es als Basis-Therapie geeignet.

Procain-Penicillin ist gegen alle Penicillin-empfindlichen Keime wirksam.

2.1.1.2. Streptomycin und Dihydrostreptomycin

Der Streptomycin bildende Stamm "Streptomyces griseus" wurde 1943 isoliert. 1946 erfolgte die Darstellung von Dihydrostreptomycin. Streptomycin ist eine gut wasserlösliche Base, die aus 3 Molekülteilen aufgebaut ist.

Die Konstitutionsformel lautet:



Die Wirkungsbereiche von Streptomycin und Dihydrostreptomycin sind identisch und erstrecken sich auf gramnegative - weniger auf grampositive - Bakterien und Kokken sowie vor allem auf Mykobakterien.

Die Wirkung von Streptomycin ist im Proliferationsstadium der Bakterien zuverlässiger als im Ruhestadium. Der Wirkungseintritt von Streptomycin erfolgt innerhalb von 1 bis 2 Stunden mit sofortiger Vermehrungshemmung. Unter anaeroben Verhältnissen ist Streptomycin weitgehend unwirksam. Streptomycin ist nur gegenüber extrazellulär gelagerten Keimen wirksam und zeigt bakteriostatische oder bakterizide Wirkung.

Bei der Streptomycin-Therapie ist die Möglichkeit der induzierten Resistenzsteigerung der Bakterien, die bei rasch wachsenden Keimen bereits nach wenigen Tagen auf-

treten kann, zu beachten. Streptomycin-inaktivierende Enzyme bakteriellen Ursprungs sind nicht bekannt.

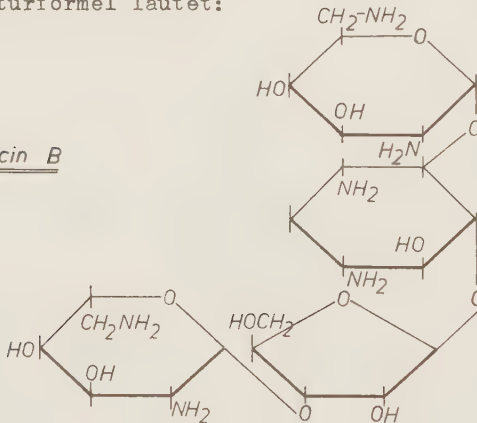
Während Streptomycin nach intramuskulärer Gabe rasch resorbiert wird, kann es nach oraler Gabe praktisch nicht resorbiert werden.

Die Häufigkeit Streptomycin-resistenter Keimarten macht einen gezielten Einsatz (Antibiogramm) erforderlich.

2.1.1.3. Neomycin

Neomycin wurde 1949 von WAKSMAN und LECHEVALIER beschrieben, die das Antibiotikum aus Kulturfiltraten, u.a. von Streptomyces fradiae isoliert hatten. Die Strukturformel lautet:

Neomycin B



Die Summenformel lautet $C_{22}H_{58}O_{16}N_8$

Neomycin ist eine farblose, hygroskopische und lichtempfindliche Substanz mit basischem Charakter. Es kommt als Sulfat in den Handel. Die wässrige Lösung ist im pH-Bereich von 2 - 9 weitgehend stabil.

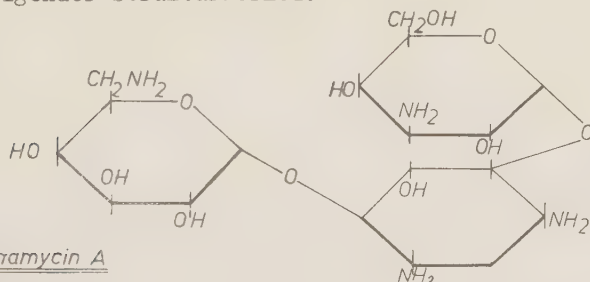
Der Wirkungsbereich des Neomycin umfaßt gramnegative Bakterien und Kokken. In vitro wirkt Neomycin bakterio-statisch, bei geringer Konzentrationserhöhung bakterizid. Es bewirkt eine Verfälschung des genetischen Codes und Störung der sequenzgerechten Proteinsynthese der Bakterien. Nach oraler Gabe wird Neomycin nur geringgradig resorbiert. Die intramuskuläre Gabe ist nicht

mehr empfehlenswert, da Neomycin wie Kanamycin bei parenteraler Gabe zu nephro- und ototoxischen Schädigungen führen kann. Selbst bei vorsichtiger Anwendung muß bei mindestens 10 % der Patienten mit Hörschäden gerechnet werden.

Allergische Reaktionen sind auch bei lokaler Verabreichung selten. Durch hohe orale Gaben von Neomycin kann - vor allem bei Kindern - eine Verschlechterung der Resorptionsverhältnisse im Magen-Darm-Trakt mit schweren Ernährungsstörungen ausgelöst werden.

2.1.1.4. Kanamycin

Kanamycin wurde 1955 aus Kulturfiltraten des Streptomyces kanamyceticus isoliert und 1957/58 in die Therapie eingeführt. Kanamycin-Base besteht aus 3 Komponenten: Kanamycin A, B und C. Das handelsübliche Kanamycin-Sulfat enthält etwa 98 % Kanamycin A mit einer Summenformel von $C_{18} H_{36} N_4 O_{11}$ und mit folgender Strukturformel:



Kanamycin A

Kanamycin ist eine farblos-gelbliche Substanz, die als Sulfat gut in Wasser löslich ist.

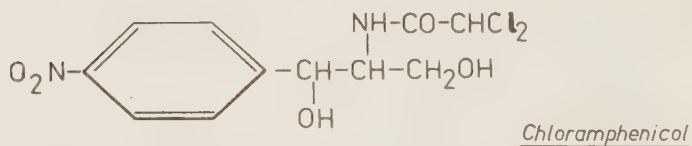
Der Wirkungsbereich des Kanamycin umfaßt gramnegative Bakterien und Kokken, grampositive Bakterien und Kokken (vor allem Staphylokokken, während Streptokokken resistent sind) und Tuberkulosebakterien. In vitro wirkt Kanamycin bakteriostatisch und bei Erhöhung der Konzentrationen um den 2-,4-,6-fachen Wert bakterizid, wobei die Wirkung auf proliferierende Keime ausgerichtet ist. Kanamycin soll die Proteinsynthese der Bakterien stören. Unter anaeroben Be-

dingungen ist Kanamycin weitgehend unwirksam. Kanamycin wird nicht an Serumeiweiß gebunden.

2.1.1.5. Chloramphenicol

Chloramphenicol wurde 1947 von Streptomyces venezuelae isoliert. 1949 wurde die Strukturformel bekanntgegeben und das Präparat in den USA eingeführt. Nur in der ersten Zeit wurde Chloramphenicol biologisch gewonnen; seit etwa 1950 ist nur noch das synthetisch hergestellte Präparat im Handel.

Chloramphenicol hat folgende Strukturformel:



Es hat die Summenformel $C_{11} H_{12} N_2 O_5 Cl_2$

Die beiden asymmetrischen Kohlenstoffatome (x) ermöglichen 4 Stereoisomere. Chloramphenicol kristallisiert in farblosen Plättchen und in feinen Nadeln. In Wasser ist es nur schwer, in Alkohol gut löslich.

Chloramphenicol weist einen breiten Wirkungsbereich bei gleichzeitig zuverlässiger Wirkung gegenüber den meisten Krankheitserregern auf. Der Wirkungsbereich umfaßt gramnegative Bakterien, grampositive und gramnegative Kokken, grampositive Bakterien sowie Sporenbazillen, Aktinomyceten, Spirochäten sowie Leptospiren, Rickettsien und die Gruppe der großen Viren.

Der Wirkungsbereich ist gegenüber den meisten Bakterien auffallend einheitlich und liegt im Bereich von 1 - 10 g/ml. In therapeutisch erreichbaren Konzentrationen wirkt es bakteriostatisch. Chloramphenicol hemmt die Proteinsynthese der Bakterien und ist auch bei Keimen im Ruhestadium, wesentlich zuverlässiger jedoch im Proliferationsstadium, wirksam.

Resistenzsteigerungen unter der Therapie sind praktisch nicht zu befürchten.

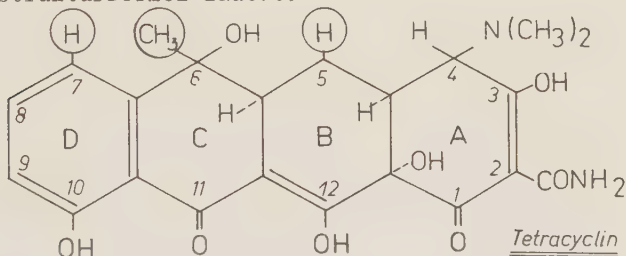
Über die Bedeutung der Eiweißbindung liegen bisher keine Angaben vor. Chloramphenicol wird rasch resorbiert. Lokale Reizerscheinungen und allergische Reaktionen nach Chloramphenicol-Gaben sind relativ selten und gutartig (0,5 - 1,5 % der Patienten).

2.1.1.6. Tetracycline

Das erste Antibiotikum der Tetracyclin-Reihe wurde 1945 im Rahmen systematischer Forschung aus Streptomyces aureofaciens isoliert und Chlortetracyclin genannt.

1949 wurde das zweite Antibiotikum der Tetracyclin-Gruppe, das Oxytetracyclin, aus dem Streptomyces rimosus dargestellt. Bereits 1950 wurde es in den Handel gebracht.

Die Strukturformel lautet:



Die Tetracycline weisen ein gleichartiges Wirkungsspektrum und eine komplette Kreuzresistenz auf.

Die Tetracycline sind amphotere kristalline Verbindungen, die mit Säuren und Alkalien löslichere Salze bilden. In Trockensubstanz sind die Tetracycline stabil.

Der Wirkungsbereich der verschiedenen Tetracycline umfaßt grampositive und gramnegative Kokken, die meisten gramnegativen Bakterien, grampositive Bakterien, Anaerobier, Sporenbazillen sowie Aktinomyzeten, Spirochäten, Leptospiren und in hohen Konzentrationen Amöben, Rickettsien und die Gruppe der großen Viren.

Weitgehend resistent sind - außer den Tetracyclin-resistenten Mutanten der erwähnten Keimarten - meist

Proteus vulgaris und Pseudomonas aeruginosa sowie gelegentlich Aerobacter aerogenes.

Die Tetracycline wirken in üblichen therapeutisch erreichbaren Konzentrationen bakteristatisch. Die Wirkung bei proliferierenden Keimen ist zuverlässiger als im Ruhestadium.

Die Tetracycline wirken gegen extra- und intrazellulär gelagerte Bakterien, wobei die Wirkung von den jeweiligen pH-Werten abhängig ist.

Wie Chloramphenicol hemmen auch die Tetracycline die Proteinsynthese, wobei jedoch der Wirkungsmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

Resistenzsteigerungen von Bakterien gegenüber Tetracyclinen unter der Therapie stellen im allgemeinen kein therapeutisches Problem dar.

Die Tetracycline werden zu etwa 30 - 50 % im Organismus inaktiviert. Spezifische inaktivierende bakterielle Enzyme sind aber nicht bekannt.

Bei oraler Gabe wird Tetracyclin rasch, doch unvollkommen und unterschiedlich resorbiert. Bei etwa 4 - 6 % der mit Tetracyclinen behandelten Patienten werden Nebenwirkungen infolge Beeinflussung der physiologischen Darmflora festgestellt. Nach einer Tetracyclin-Therapie können Ablagerungen von Tetracyclin in Zähnen, Knochen, Nägeln und Gewebe beobachtet werden. Diese Speicherung ist durch eine Tetracyclin-Bindung an das Kalzium im Knochen bzw. in den kollagenen Fasern verursacht.

2.1.1.7. Spiramycin

Spiramycin gehört wie Oleandomycin und Erythromycin zur Gruppe der Makrolid-Antibiotika. Es besteht aus 3 Komponenten und wurde 1954 erstmals von Streptomyces ambofaciens gewonnen.

Spiramycin, ein Gemisch von organischen Basen, ist eine amorphe, gelbliche, in Wasser schwer, in organischen Lösungsmitteln gut lösliche Substanz.

Der Wirkungsbereich entspricht dem des Erythromycin und Oleandomycin und umfaßt grampositive Bakterien und Kokken - vor allem Staphylokokken - und gram-negative Kokken. Gegenüber gramnegativen Bakterien, Brucellen, Spirochäten und großen Viren ist die Wirkung gering.

Spiramycin wirkt in therapeutisch erreichbaren Konzentrationen bakteristatisch. Es wirkt nur bei wachsenden Keimen, nicht bei Erregern im Ruhestadium. Das Wirkungsoptimum liegt bei pH 8,0, die Wirksamkeit fällt bereits bei pH 7 um 95 % ab. In vitro kann eine relativ rasche Resistenzsteigerung erzielt werden. In Tierseren ist die Eiweißbindung gering.

2.1.2. Die allgemeine therapeutische Anwendung von Antibiotika bei Milchtieren.

Für den therapeutischen Gebrauch bei Milchtieren steht eine Vielzahl Antibiotika-haltiger Zubereitungen zur lokalen (Salben, Pasten, Puder, Sprays), zur oralen (Pulver, Kapseln, Preßlinge) und parenteralen Anwendung (Lösungen, Suspensionen) zur Verfügung. Für besondere Indikationen sind auch Kombinationen entwickelt worden. Die Dosierung der antibiotischen Präparate wird so gewählt, daß am Infektionsherd (Gewebe) oder im Blut (Blutspiegel) eine therapeutisch wirksame Konzentration des Mittels erreicht und genügend lange aufrechterhalten wird. Einer vor allem durch unzureichende Dosierung geförderten Entwicklung resistenter Keime wird durch entsprechend hohe Gaben oder durch Wechsel in der Wahl der Antibiotika entgegengetreten (86).

Die Indikation für die parenterale Anwendung der Antibiotika bei Milchtieren sind bakteriell bedingte generalisierte oder lokale Infektionen. Die orale therapeutische Verabreichung von Antibiotika kommt vor allem bei bestimmten Indigestionen und Darmentzündungen in Betracht (86).

2.1.3. Die spezielle Anwendung von Antibiotika bei der Mastitistherapie der Milchtiere.

Die Antibiotika-Therapie des Euters ist milchhygienisch von besonderer Bedeutung, da hier bevorzugt mit einer erheblichen Ausscheidung mit der Milch zu rechnen ist.

Maßnahmen mit dem Ziel, Euterentzündungen des Rindes therapeutisch zu beeinflussen, sind schon vor Einführung der Antibiotika durchgeführt worden. Die ersten Versuche einer kausalen Therapie war die Installation von Akridinfarbstoffen ins Euter. Nach der Entdeckung der Sulfonamide von DOMAGK wurden etwa ab 1936 Versuche zur Mastitistherapie mit Sulfonamiden durchgeführt, die jedoch bei chronischen Mastitiden bei parenteraler Applikation nur in seltenen Fällen zum Erfolg führten (35). Die Sulfonamid-Therapie verlor an Bedeutung, nachdem 1944 von KAKAVAS erstmalig Penicillin intramammär zur Behandlung der *Streptococcus-agalactiae*-Mastitis mit zufriedenstellendem Erfolg eingesetzt wurde (35).

Auch ein Teil der in der Folgezeit entdeckten Antibiotika erwiesen sich als zur Behandlung von Euterentzündungen geeignet. Außer Penicillin haben noch folgende Antibiotika Verbreitung in der Mastitis-Therapie gefunden: Streptomycin, Neomycin, Kanamycin, Chloramphenicol, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Spiramycin (35).

2.1.4. Die nutritive Anwendung von Antibiotika bei Tieren.

Neben den in der Bundesrepublik Deutschland als Wirkstoffe bei Tieren zugelassenen Vitaminen, Aminosäuren, Spurenelementen, Dotterpigmenten, Antioxydantien, Emulgatoren und Coccidiostatica werden auch Antibiotika in steigendem Umfange zum Zwecke der Wachstumsförderung als nutritive Futterzusätze angewandt (30). Während die für die therapeutische Anwendung erforderlichen Verabreichungsformen und Dosierungen der Antibiotika

verschreibungspflichtig sind, werden in Futtermittel eingemischte Antibiotika frei verkauft (49). Die zugelassenen Mengen von Antibiotika im Alleinfutter betragen maximal bis 120 ppm und führen zu Rückständen im Fleisch, die bei sachgemäßer Anwendung unterhalb der Nachweisgrenze liegen und die beim Stand der heutigen Kenntnisse als gesundheitlich unbedenklich angesehen werden müssen (30). Derzeit dürfen in der Bundesrepublik Deutschland nur die Antibiotika-Substanzen Flavophospholipol, Oxytetracyclin, Chlortetracyclin, Zink-Bacitracin und Oleandomycin in Futtermittel für Küken, Schweine, Ferkel und Kälber eingemischt werden (78). In anderen Ländern werden weitere Antibiotika in der Tierernährung angewendet.

2.2. Die Ausscheidung der Antibiotika über die Milch.

2.2.1. Die Ausscheidung nach parenteraler Anwendung.

Auch intramuskulär, intravenös und subcutan applizierte Antibiotika werden mit der Milch ausgeschieden, da die Gewebsschranke zwischen Blutstrom und Euter bis zu einem gewissen Grade Antibiotika-durchlässig ist (35).

Bei intramuskulärer Applikation von Antibiotika zeigen sich zwar ähnliche Effekte wie bei der intramammären (100); die Ausscheidung von Antibiotika in der Milch ist jedoch verkürzt und es wird auch eine gleichmäßigere und vollständigere Verteilung des Antibiotikums als bei der intramammären Gabe erreicht (87).

Aus zahlreichen Versuchen geht hervor, daß bei intramuskulärer Anwendung Penicillin in der Milch ausgeschieden wird, wenn die Gesamtdosis mehr als 1 Million Einheiten pro Tier beträgt. Die Konzentration wird gewöhnlich mit 0,05 - 0,07 E pro ml in der ersten und mit 0,02 - 0,05 E/ml in der zweiten Melkzeit angegeben (5), ausnahmsweise können auch 1 Einheit pro ml Milch ausgeschieden werden (40). Nach intravenösen und retroperitonealen Gaben erscheint Penicillin rasch und in

etwas höherer Konzentration, ist aber auch rascher aus der Milch verschwunden, nach intramuskulärer Applikation hält die Ausscheidung etwas länger an. Wäßrige Präparate werden rascher ausgeschieden als an ölige Trägersubstanzen gebundene Präparate. Solche sind schon bis zu 7 Tage lang in der Milch festgestellt worden und sollen deshalb für die Allgemeinbehandlung der Milchkühe ungeeignet sein (109).

BLOBEL (12) ermittelte die Ausscheidungs-Konzentrationen von Streptomycin nach intramuskulärer, von Oxytetracyclin nach intravenöser und intramuskulärer und von Chlortetracyclin nach intravenöser Applikation. Während er nach der intramuskulären Anwendung von Streptomycin maximal 0,05 bis 0,1 γ Wirkstoff pro ml Milch feststellte, enthielt die Milch der Kühe, die mit Oxytetracyclin behandelt wurden, 3 bis 5 γ pro ml Milch. Nach intravenöser Anwendung von Chlortetracyclin gelang in der Milch der Nachweis des Antibiotikums in der Menge von 0,3 bis 3 γ pro ml Milch. Die Ausscheidungszeiten betrugen maximal 2 bis 3 Tage.

BAUMGARTNER und MÜLLER (5) konnten bei gesunden Milchtieren nachweisen, daß die die Blut-Milch-Schranke passierenden Mengen von Streptomycin nach parenteraler Anwendung verhältnismäßig gering sind. Maximal konnten sie 0,7 γ Streptomycin je ml Milch nachweisen. Bei Chloramphenicol und besonders bei Tetracyclinen fanden sie nach intramuskulärer, intravenöser und retroperitonealer Anwendung Antibiotika-Konzentrationen, die noch bis zur 100-fachen Verdünnung der Einzelmilch Säurehemmung zeigten. Maximal konnten 4 γ Chloramphenicol und 4 γ Chlortetracyclin je ml Milch nachgewiesen werden.

Die Ausscheidungsverhältnisse nach intravenöser Applikation gleichen denen nach intramuskulärer (100), mit der Einschränkung, daß intravenös verabreichte Antibiotika in der Regel nur bis 48 Stunden zu nachweisbaren Mengen in der Milch führen können (11, 14, 17, 87) (Tabelle 1).

Auch nach subkutaner Anwendung von Oxytetracyclin muß nach den Ergebnissen von MIETH und WILKE (67) mit einer Ausscheidung von Oxytetracyclin in der Milch gerechnet werden.

Zur Frage der Antibiotika-Ausscheidung über die Milch nach intrauteriner Anwendung besteht keine einheitliche Auffassung.

DIERNHOFER (18) vertrat bereits 1955 die Ansicht, daß nach intrauteriner Antibiotika-Anwendung eine Ausscheidung über die Milch nicht zu erwarten sei. Aufgrund eigener Untersuchungsergebnisse gelangten auch MIETH und WILKE (67) zu der Auffassung, daß bei Anwendung therapeutischer Dosen zur intrauterinen Behandlung keine meßbaren Werte an Antibiotika in der Milch ermittelt werden können.

Diesen Meinungen steht gegenüber, daß CANNON et al. (17) nach intrauteriner Gabe von 1.000.000 IE Penicillin in wäßriger Lösung bis 31 Stunden nach der Anwendung Penicillin in der Milch ermitteln konnten.

Tabelle 1: Antibiotika-Rückstände in Milch nach intramuskulärer Applikation (nach TE-PLAN und ZAADHOF (100), ergänzt durch weitere Literaturangaben).

Antibiotikum	Dosis pro Tier bzw. Gewichtseinheit	Stunden nach Behandlung	Rückstand/ ml Milch in i.E. bzw. γ
Procain- Penicillin G (wäßr. Lösung)	2.000 IE/lb	30	0,02
	3.000 IE/lb	72	Spuren
	5.000 IE/lb	48	0,02
	6.000 IE/lb	60	Spuren
	10.000 IE/lb	54	0,03
	100.000 IE/Tier	120	Spuren
	3.000.000 IE/Tier	24	0,023
	6.000.000 IE/Tier	36	Spuren
	9.000.000 IE/Tier	60	0,004
	15.000.000 IE/Tier	24	0,07
(ölige Suspension)	2.000 IE/lb	48	0,01
	2.500 IE/lb	12	0
	5.000 IE/lb	48	0,01
	6.000 IE/lb	144	Spuren
	10.000 IE/lb	150	0,02
	1.000 .000 IE/Tier	6	0
	6.000 .000 IE/Tier	12	0
Chlortetra- cyclin	2,4 mg/kg	36	0,1
	2,0 mg/lb	30	0,34
	4- 8 mg/kg	48	0
	11,0 mg/kg	48	1,8
Oxytetracyclin	1,0 g/Tier	12	0
	1,5 g/Tier	48	0,36
	2,0 g/kg	24	0,30
	4,0 g/kg	48	0,10
Streptomycin	5 mg/lb	12	0,24-0,4
	11 mg/lb	24	0,32
	0,5- 1,0 g /50 kg	36	0
	5 g/Tier	12	2,6
	5 g/Tier	24	0
	9 g/Tier	36	0
Chlorampheni- col	10 mg/kg	24	1,5
	5 g/Tier	12	0
Neomycin	6 g/Tier	24	1,1

2.2.2. Die Ausscheidung nach intramammärer Anwendung

Nach intramammärer Applikation von Antibiotika bei Milchtieren sind Höhe und Dauer der Antibiotika-Ausscheidung mit der Milch abhängig von Art und Konzentration des angewendeten Stoffes, der Träger- bzw. Vehikelsubstanz, der Milchleistung des behandelten Viertels und dem Zeitunterschied zwischen Behandlung und Melken (15). Zu berücksichtigen sind weiterhin die über das Eutergewebe in den Blutstrom übergehenden Antibiotika-Mengen und die Häufigkeit der Applikationen. Außerdem gibt es erhebliche individuelle Unterschiede, die mit einer angeborenen unterschiedlichen Resorptionsfähigkeit des Eutergewebes zusammenhängen dürften (35).

Intramammär applizierte Penicillin-Präparate, die Pflanzenöle, Mineralöle oder Aluminiummonostearat als Vehikel enthalten, weisen längere Ausscheidungszeiten auf als solche auf wäßriger Grundlage (100). Die Ausscheidungszeiten für Streptomycin, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin und Chloramphenicol entsprechen im allgemeinen denen von Penicillin (35).

TERPLAN und ZAADHOF (100) stellten in einer Tabelle Literaturangaben zur Antibiotika-Ausscheidung in Milch nach intramammärer Verabreichung zusammen.

Tabelle 2: Die Ausscheidung von Antibiotika in der Milch nach intramammärer Applikation (nach TERPLAN und ZAADHOF (100)).

Antibiotikum	Dosis pro Viertel	Std. nach Behandlung	Rückstand/ml Milch in IE bzw. γ
Procain Pen. G (wäŕr. Lösung) (ölige Suspens.)	100.000 IE	72	Spuren
	100.000 IE	48	Spuren
	300.000 IE	120	< 0,06
	500.000 IE	48-72	Spuren
	100.000 IE	96	Spuren
	100.000 IE	48	Spuren
	300.000 IE	216	< 0,06
	500.000 IE	96	0,29
Chlortetra- cyclin	210 mg	120	0,25
	400 mg	24	< 1,00
	1.000 mg	60	< 1,00
Oxytetracyclin	400 mg	72	0
	400 mg	24-72	Spuren
Streptomycin	250 mg	72	0
	300 mg	48	1,00
	500 mg	72	0
	500 mg	96	0, 1-0, 2
Chloramphenicol	500 mg	24	0

Bei intramammärer Applikation erscheinen alle Antibiotika - in wäŕriger Suspension deutlicher als in öliŕer - auch in der Milch der unbehandelten Viertel (46). Der Übergang erfolgt in der Hauptsache durch Vermittlung des Blutkreislaufs, während die direkte Diffusion von Viertel zu Viertel eine untergeordnete Rolle spielt (35). Die Ausscheidungsmenge ist aber nur gering (12).

2.2.3. Die Ausscheidung nach nutritiver Anwendung.

Bei nutritiver Anwendung von Antibiotika bei Milchtieren ist mit beträchtlichen Rückstandsmengen zu rechnen. Dieser Weg der Kontamination der Milch mit Antibiotika kann jedoch in der Praxis außer acht gelassen werden, da in der Bundesrepublik Deutschland die Verwendung von Antibiotika als nutritiver Wirkstoff bei Milchkühen nicht erlaubt ist (29).

2.3. Die Bedeutung Antibiotika-haltiger Milch für den Verzehr durch Menschen und für die Molkereiwirtschaft.

2.3.1. Die Auswirkungen Antibiotika-haltiger Milch auf den Verbraucher.

In der Human-und Veterinärmedizinischen Literatur besteht Übereinstimmung darüber, daß der Verbrauch Antibiotika-haltiger Milch eine Gefahr für den Menschen bedeutet (6,8,9,10,13,15,16,19,27,31,34,35,41,43,46,48,51,60,66,70,79,80,82,86,88,89,92,96,97). Besondere Bedeutung kommt hierbei dem Penicillin zu, da es unter allen Antibiotika die stärkste antigene Aktivität besitzt und somit Allergien auslösen kann (21).

Geringe, in der Milch vorhandene Penicillin-Konzentrationen sind nicht in der Lage, gesunde Menschen spezifisch zu allergisieren. Es muß aber angenommen werden, daß Penicillin-haltige Milch auch in geringen Konzentrationen bei, etwa durch vorangegangene Behandlung, bereits spezifisch sensibilisierten Menschen Allergien auslösen kann (8,10,15,16,51,80,100).

Die Zahl der gegenüber Penicillin sensibilisierten Menschen ist nicht unbeträchtlich. So sollen nach den Angaben von BREHM (13) in den USA 10 bis 15 Millionen Menschen an einer Penicillin-Allergie gelitten haben. TERPLAN und ZAADHOF (100) zitieren Literaturangaben zu Erkrankungen, bei denen nachweislich nach dem Genuß Penicillin-haltiger Milch Urtikaria, Ekzeme und auch schwere anaphylaktische Reaktionen beobachtet wurden. OBIGER (80) beschreibt einen schweren Fall von Urtikaria

bei einem 14-jährigen Jungen, der auf das Trinken von Milch Penicillin-behandelter Milchkühe zurückgeführt wurde.

Gemessen an den schweren durch Penicillin hervorgerufenen allergischen Komplikationen treten nach HEIDELMANN (34) bei Streptomycin, Chloramphenicol, den Tetracyclinen, der Erythromycin-Oleandomycin-Gruppe, Neomycin und Kanamycin kaum Komplikationen auf.

Dagegen geht KNOTHE (51) davon aus, daß auch alle anderen Antibiotika nach einem "Ersteinbruch" in den menschlichen Organismus spezifische und nur gegen sich selbst gerichtete Antikörper bilden können. Bei einem zweiten oder wiederholten Aufnahmen des gleichen körperfremden Stoffes sollen dann unmittelbar die zahlreichen Organreaktionen, die als "allergische" Krankheiten bezeichnet werden, entstehen.

FILIPP (21) berichtet von Überempfindlichkeitsreaktionen nach Anwendung von Streptomycin, seltener von Dihydrostreptomycin. Schwerste Reaktionen (z.B. anaphylaktischer Schock) seien dabei aber sehr selten.

Zwar hält KNOTHE (51) es für erwiesen, daß der Mensch mit wesentlich stärkeren allergischen Erscheinungen reagiert als das Tier, doch sind, insbesondere beim Pferd, Rind, Schwein und Hund, nach Behandlung mit Antibiotika schwere Zwischenfälle bekanntgeworden (9,86). Die zum Teil sogar tödlich verlaufenden anaphylaktischen oder allergischen Reaktionen, besonders nach dem Verabreichen von Penicillin und Streptomycin-Penicillin, vereinzelt auch von Oxytetracyclin und Neomycin, traten innerhalb von 30 bis 90 Minuten nach der Verabfolgung auf (86).

Als weitere Folge des Verzehrs Antibiotika-haltiger Milch wird die Entwicklung einer Antibiotika-Resistenz bei Bakterienstämmen für möglich gehalten (4,8,19,27,43,97).

DRAGON (19), BECKER (8) und PICHNARCIK et al. (82) diskutieren eine Veränderung der Darm- und Mundflora als Folge der Aufnahme Antibiotika-haltiger Lebensmittel einschließlich Milch. Hierbei soll die gesundheitliche Beeinflussung vornehmlich in einer Verminderung der Vitaminsynthese bestehen (97). Durch den Verzehr von Nahrungsmitteln, die von mit Antibiotika gefütterten Tieren stammen, sollen dagegen mit Sicherheit keine Störungen des sogenannten symbiontischen Gleichgewichts der Mund- und Darmflora ausgelöst werden (50). TIEWS (102) und KNOTHE (51) bedauern, daß hierzu keine "exakten" Angaben vorliegen.

In der Literatur werden als weitere Möglichkeit der Gesundheitsschädigung beim Verbraucher durch unbeabsichtigten Verzehr Antibiotika-haltiger Lebensmittel deren toxische Wirkungen angeführt (27,43). Diese sollen vielgestaltig, zum Teil schwerwiegend und irreversibel sein (34,88).

2.3.2. Die Auswirkungen Antibiotika-haltiger Milch auf die molkereiwirtschaftliche Technologie.

Die Verarbeitung Antibiotika-haltiger Milch stellt die Molkereiwirtschaft vor sehr ernste Probleme. Antibiotika-haltige Milch stört die Käse- und Butterfabrikation, da sie die für die Herstellung von Sauermilchprodukten benötigten Antibiotika-empfindlichen Milchsäurebakterien hemmt (1,4,6,8,15,16,19,22,29,32,33,35,37,38,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,60,65,70,79,80,85,89,92,94,96,97,100).

Zur Empfindlichkeit der wichtigsten Milchsäurebakterien gegenüber den in der Milchvorkommenden

Hemmkonzentrationen verschiedener Antibiotika gegenüber molkereitechnologisch wichtigen Mikroorganismen (Tabelle 3), GALESLOT und HASSING (26), KRAAK und TOLLE (56) und OBIGER (80) ermittelten auch die Hemmkonzentrationen für den Indikatorkeim Bac. stearothermophilus var. calidolactis.

Tabelle 3: Empfindlichkeit von molkereitechnologisch wichtigen Mikroorganismen und von Bac. stearothermophilus gegenüber den gebräuchlichen Antibiotika.

Kultur	Antibiotika-Konzentration				
	Penicillin	Streptomycin	Chloramphenicol	Chlor-tetracyclin	Oxytetracyclin
	IE/ml	γ /ml	γ /ml	γ /ml	γ /ml
Str. thermophilus	0,0017 -0,17	0,5-5	0,05-0,1	0,001 -0,01	0,001 -0,01
Str. cremoris	0,05-0,1	-	-	-	-
Lb. bulgaricus	0,3 -0,6	-	0,3 -5	-	-
Butter-säurewecker	0,017 -0,17	0,1-0,2	0,1 -0,2	0,01-0,1	0,01-0,1
Käse-säurewecker	0,05-0,2	0,04	0,04	0,02 -0,25	0,01
Bac. stearothermophilus var. calidolactis	0,001 -0,008	0,6-1	1	0,6-1	1

Den der milchverarbeitenden Industrie durch Fehlproduktionen und Qualitätsminderungen infolge säuerungs-träger Milch entstehenden jährlichen Schaden beziffert LIMMER (63) auf 400 bis 500 Millionen DM, wobei jedoch zu beachten ist, daß auftretende Säuerungsschwierigkeiten nicht in jedem Falle durch Antibiotika hervorgerufen werden (47). Auch das für die Bezahlung der Anlieferungsmilch wichtige Resultat der Reduktaseprobe kann durch Antibiotika-haltige Milch beeinträchtigt werden, da eine wesentlich bessere Milchqualität vorgetäuscht wird (8). Werden Reinigungs- und Desinfektionsmittel vorschriftsmäßig angewendet, dann findet keine Beeinflussung des Keimwachstums in der Milch statt. SEELEMANN und WEGENER (93) und MÜNCH et al. (72) zeigten jedoch, daß hohe Konzentrationen einzelner Reinigungs- und Desinfektionsmittel in der Lage sind, eine "Milchschönung" herbeizuführen, d.h. hemmend auf Milchsäurebakterien einzuwirken. Chlorverbindungen und zum Teil auch phenolhaltige Präparate werden bei vorschriftsmäßigem Gebrauch durch die Milch entgiftet, so daß sie dann keine Hemmstoffe, sondern Fremdstoffe darstellen (44).

2.4. Der Nachweis von Antibiotika in Milch.

In zahlreichen Veröffentlichungen über die Bedeutung der Nachweismethoden von Antibiotika und Hemmstoffen wurde von den Autoren die Notwendigkeit und Wichtigkeit des Nachweises dieser Stoffe herausgestellt (15, 16, 19, 20, 52, 54, 65, 73, 79, 81, 82, 97, 99, 100).

Beim Nachweis von Hemmstoffen in der Milch wird unterschieden zwischen chemischen, mikrobiologischen und Farbstoffmarkierungs-Methoden.

2.4.1. Chemische Nachweismethoden.

Der chemische Nachweis bestimmter Hemmstoffe in der Milch erfolgt über die Identifizierung einer charakteristischen Komponente wie zum Beispiel des Chlors in

Chloramphenicol. Seltener werden Hemmstoffe über eine nicht antibiotische Komponente, z.B. das Prokain in Prokain-Penicillin oder durch die Feststellung bestimmter Absorptionsmaxima im UV-Bereich und die des optischen Drehungsvermögens nachgewiesen (16). Nach allgemeiner Auffassung sind die chemischen Nachweismethoden für Reihenuntersuchungen ungeeignet, da sie in einem Untersuchungsgang nur den Nachweis einer definierten chemischen Verbindung bzw. Gruppe erlauben (16, 37, 65, 100), und verglichen mit den mikrobiologischen Nachweismethoden zu empfindlich sind (67, 97).

2.4.2. Mikrobiologische Nachweismethoden.

Diese Methoden beruhen auf der besonderen Empfindlichkeit einiger Mikroorganismen gegenüber Hemmstoffen (100), wobei im allgemeinen alle nachgewiesenen bakteriostatisch bzw. bakterizid wirkenden Substanzen in der Milchwirtschaft pauschal als Hemmstoffe bezeichnet werden (16, 79).

Man kann die mikrobiologischen Nachweismethoden einteilen nach den Prinzipien der Agardiffusion, der Farbstoffreduktion, der Säurebildungs- und Koagulationshemmung sowie den morphologischen Veränderungen der Testkeime (16).

Das Agardiffusions- oder Plattenverfahren kann als Lochtest oder als Zylindertest durchgeführt werden, wobei in die mit den Testkeimen beimpften Nährböden entweder Löcher gestanzt oder Metallzylinder aufgesetzt werden und diese mit der zu untersuchenden Probe beschickt werden. Eine weitere Möglichkeit des Agardiffusions- oder Plattenverfahrens besteht darin, daß saugfähige Papierblättchen in die zu untersuchende Milchprobe getaucht und dann auf Nährböden aufgebracht werden. Bei Anwesenheit von Hemmstoffen bildet sich nach der Bebrütung um das Loch, den Zylinder oder um die Blättchen eine Hemmzone, die von der übrigen gleichmäßig mit den Testkeimen bewachsenen

Agarfläche abgegrenzt ist (26).

Nach dem gleichen Prinzip läßt sich der von KRAAK und TOLLE (56) beschriebene Brillantschwarz-Reduktionstest durchführen. Die Autoren verwenden als Testkeim Bac. stearothermophilus var. calidolactis, den sie zusammen mit dem Indikator Brillantschwarz dem Nährboden zusetzen. Beim Wachstum der Testkeime wird der ursprünglich blau gefärbte Nährboden entfärbt; werden jedoch die Testkeime während des Bebrütens gehemmt, kann eine Entfärbung des Nährbodens nicht eintreten. Bei der von NEAL und CALBERT (74) empfohlenen Farbstoffreduktionsmethode wird als Indikator Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) verwendet. Das Wachstum der zugesetzten Testkeime färbt das farblose TTC zum roten Formazan um.

Als weitere Nachweismethode wird die Säuerungsprobe angewendet. WODSAK (108) empfahl als Testkeim den Streptococcus thermophilus zu der zu untersuchenden Milch. Dagegen hielten FLEISCHMANN (22) und später DRAGON (19) die Joghurtkultur als Testkeime besonders geeignet. Sie bestimmten die Säuerung der Milch nach der Bebrütung durch Titration mit 4/n Natronlauge nach SOXLET-HENKEL. Den Hemmstofftest unter Verwendung von Joghurtkultur und Lackmuslösung haben WELZ (105) bzw. RACKOW und WELZ (83) beschrieben. Sie erhitzten 10 ml Milch für die Dauer von 5 Minuten auf 80°C im verschlossenen Reagenzglas und gaben nach Abkühlung auf etwa 40°C 0,5 ml sterile Lackmuslösung hinzu. Dann beimpften sie die Milchprobe mit 0,5 ml Joghurtkultur als Testkeime und bebrüteten bei 40°C bis zur Säurebildung und der bei Erreichen von 29 Soxlet-Henkel (SH)-Graden eintretenden Gerinnung, die durch die negative Kontrolle angezeigt wird. Sie geben der Joghurtkultur den Vorrang gegenüber der Streptococcus-thermophilus-Kultur, da die Ergebnisse schneller vorliegen. Auch LANG (60) kam auf Grund vergleichender Unter-

suchungen zu dem Ergebnis, daß mittels der Säuerungsprobe mit Lackmus auf einfache Weise die Möglichkeit besteht, Milch mit einer für molkereitechnologische Belange ausreichenden Genauigkeit auf Antibiotika zu überprüfen.

Bei der von FRANK (23, 24) beschriebenen Methylenblauprobe wird die Reduktionszeit des Methylenblaus als Maß für eventuell in der Milch vorhandene Hemmstoffe gewertet.

Die von LISKA (64) erarbeitete direkte mikroskopische Methode ist nicht gebräuchlich. Er beimpft die zu untersuchende Milchprobe mit Streptococcus thermophilus. Nach Bebrütung wird mikroskopisch die Anzahl der in der Milch vorhandenen Bakterienzellen und deren morphologische Strukturen geprüft. Als Kontrolle dient eine garantiert hemmstofffreie Milch.

Die verschiedenen mikrobiologischen Methoden sind von der Bundesanstalt für MilCHForschung (16) nach Gruppen geordnet in einer zusammenfassenden Tabelle dargestellt worden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Mikrobiologische Methoden zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch.

Prinzip	Methode	Testkeim	Nachweisgrenzen/ml	Inkub.-zeit bei ob. Temperatur (in Std)
Agar-diffusion	Blättchen-test=Nährkartonverf. (Papierbl. präpariert mit 20% Dextrose u. 20% Pepton)	Bac.subtilis	0,005-0,02 IE Penicillin	6
	Phasenumkehrtest =Nährkarton-Sporen-Verfahren (Papierblättchen präpariert mit Bac.subtilis-Sporen+Dextrose+Pepton+Saccharose+ TTC als Indikator)	Bac.subtilis ATCC 6633 (35-37°C)	0,002 IE Penicillin	4-6

Fortsetzung der Tabelle 4

Agar-diffusion	Blättchentest	Bac.stearo-thermophilus (55-60° C)	0,0025 IE Penicillin	2 1/2
	Blättchentest	Sarcina lutea ATCC 9341	0,005 IE Penicillin	6-8
	Brillantschwarz-Reduktionstest	Bac.stearo-thermophilus var.Calido-lactis C 953 (55-60° C)	0,006 IE Penicillin 0,8γ Chlor-tetracyclin. 8γ Streptom.	2 1/2
Farbstoff-reduktion	TTC-Test	Sc.thermo-philus (37° C)	0,03 IE Penicillin 0,2γ Chlor-tetracyclin 5γ Streptom.	2 1/2-3
	Methylenblau-Reduktionstest	Sc.thermo-philus (+Lb. bulgaricus) (37° C)	0,02 IE Penicillin 0,1γ Tetrac. 3γ Streptom.	2 1/2-3
Säure-bildg. u. Koagu-lations-hemmung	Säuerungsprobe mit Lackmus	Sc.thermo-philus (+Lb. bulgaricus) (40° C)	0,03 IE Penicillin 0,5γ Tetrac. 10-50γ Streptom.	2 1/2-3
	Säuerungsprobe mit Bromkresol-purpur	Sc.thermo-philus (45° C)	0,01-0,05 IE Penicillin	6-22
	Koagulations-test	Sc.thermo-philus (40° C)	0,02 IE Penicillin 0,5γ Chlor-te-tracyclin, 6,5γ Dihydro-streptomyc.	16
	Titration-methode	Sc.thermo-philus (+Lb. bulgaricus) (40° C)	0,008-0,01 IE Penicillin 0,02γ Chlor-tetracyclin, 0,6γ Strepto-mycin	5
Morpholo-gische Verände-rungen	Miskroskopi-scher Nachweis von morphol. Veränderungen	Sc.thermo-philus (37° C)	0,015 IE Penicillin	

2.4.3. Literaturangaben zum Vorkommen von Antibiotika in Milch.

Die in der Bundesrepublik Deutschland ermittelten Prozentzahlen über das Vorkommen von Hemmstoff-Rückständen in Milch schwanken zwischen 0,5 % (62), 2,0 % (63), 2,4 % (57), 2,9 % (23) und 3,6 % (7) für Anlieferungsmilch, liegen für Vorzugsmilch bei 2,2 % (83) und 13,5 % (7), für Mischmilch aus Tankwagen bei 0,4 % (7) und bei 2,5 % für Milch aus dem Handel (84). Bis auf die Angaben von KRAAK und TOLLE (57), die auf Hemmstoff-Untersuchungen unter Verwendung des Brillantschwarz-Reduktionstestes zurückgehen, wurden die Ergebnisse mit Säuerungsmethoden erzielt.

Die im Ausland ermittelten Prozentzahlen liegen zwischen 0,09 % und 14,3 %. JORGENSEN (41) teilt mit, daß in Dänemark 0,09 % der Tank- und Handelsmilchproben einen positiven Penicillingehalt anzeigten. In den USA fanden KOSIKOWSKI et al. (53) zunächst 7 %, dann 6 % und schließlich 0,54 % positive Proben, während GROVE (31) bei seinen Untersuchungen 1 % Hemmstoff-positive Proben finden konnte. Nach Angaben von BRUNSCHWILER (15) wiesen 5,9 % bis 11,6 % der Handelsmilch in den USA Hemmstoffe auf. Bei Untersuchungen von Anlieferungsmilch fand KÄSTLI (46) in der Schweiz 0,1 % Hemmstoff-positive Proben, während MOREL (71) in Frankreich 0,58 % und MOL (69) in den Niederlanden 0,68 % und 0,46 % positive Proben von Anlieferungsmilch ermittelten.

STOKRS und HIETT-BROWN (98) konnten in 3 Untersuchungsgruppen von Buttermilch 1,4 %, 2,8 % und 3,2 % Hemmstoff-haltige Proben ermitteln. In Holland konnten bei Trinkmilchproben aus dem Handel 1966 bis 14,3 % und 1967 bis 7,1 % Hemmstoffe nachgewiesen werden (69).

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation aus dem Jahre 1971 (110) konnten durch geeignete Überwachungsprogramme in Australien, USA und Großbritannien der

Anteil der Milch mit 0,05 oder mehr IE Penicillin/ml von 7 bis 30 % auf 0,5 bis 4 % gesenkt werden. Bei diesen Untersuchungen wurde fast ausschließlich der Agardiffusionstest als Nachweismethode angewendet.

Der Hemmstoffnachweis scheint auch jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen zu sein, da TOLLE und Mitarbeiter (16) im Sommer 2,1 % und im Winter 3,6 % positive Proben ermittelten. Zwei Drittel dieser positiven Proben enthielten Penicillin. LIMMER (63) konnte als Ursache für den positiven Hemmstofftest in der Hälfte der Fälle Antibiotika feststellen, während er bei weiteren 30 % den Verdacht auf antibiotisch wirkende Substanzen aussprach.

Aufgrund dieser Angaben dürfte es außer Zweifel stehen, daß Antibiotika-haltige, insbesondere Penicillin-haltige Milch und Milcherzeugnisse zu den Molkereien angeliefert werden oder in den Handel gelangen (29) und unmerklich, gelegentlich, wiederholt oder ständig dem Milchverbraucher zugeführt werden (80).

2.5. Die Beeinflussung der Hemmstoffwirkung von Antibiotika durch eine Erhitzung.

Über den Einfluß der Erhitzung auf die Wirkung der Antibiotika bestehen unterschiedliche Auffassungen. Aufgrund einer umfangreichen Literatursauswertung und eigener Untersuchungen kommt HAUKE (33) zu dem Ergebnis, daß die für die Pasteurisierungsverfahren vorgeschriebenen Temperaturen und Heißhaltezeiten der Milch die Aktivität von Penicillin, Streptomycin oder Oxytetracyclin in Milch nicht beeinträchtigen. Dagegen ist einem Bericht des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes (39) von 1967 zu entnehmen, daß 8 % des Penicillins während der Pasteurisierung inaktiviert werden. BECKER (8), der Anlieferungsmilch mit Penicillin und Streptomycin versetzte und mit Hilfe einer amtlich zugelassenen Kurzzeiterhitzungs-

anlage pasteurisierte, kommt zu der Feststellung, daß ca. 80 % des Penicillins und ca. 90 % des Streptomycins beim Pasteurisierungsvorgang zerstört werden. WATROUS et al. (104) konnten in Erhitzungsversuchen mit Antibiotika-haltiger Milch nachweisen, daß die Pasteurisierung meist eine zerstörende Wirkung auf Antibiotika in Milch hat. Nach SCHMID (88) wird Chlortetracyclin bereits durch Sonnenlichteinwirkung inaktiviert.

Auch bei höheren Temperaturen und wesentlich längeren Heißhaltezeiten, als sie bei der Pasteurisierung zur Anwendung kommen, konnte LANG (60) keine Zerstörung der Antibiotika feststellen. Er prüfte mit Säuerungs- und Reduktionsmethoden, ob durch Hitzeinaktivierung für 5 Minuten bei 80 bzw. 85°C eine Zerstörung der der Milch zugesetzten Antibiotika-Substanzen (Penicillin G, Streptomycin, Chlortetracyclin und Chloramphenicol) stattfindet. Jedes Antibiotikum wurde einmal vor der Inaktivierung und zum anderen nach der Inaktivierung und Abkühlung in die Milch gegeben und zeigte in keinem Falle eine Schädigung.

Dagegen ermittelte HAUKE (33) bei seinen Untersuchungen, daß bereits Heißhaltezeiten von 90 bis 100 Sekunden bei Temperaturen von 81 bis 86°C einen etwa 10 %-igen Streptomycin-Aktivitätsverlust bewirken und eine 20 %-ige Verminderung des Oxytetracyclin-Gehaltes bei Zeit-Temperatur-Kombinationen von 73 bis 86°C und 80 bis 100 Sekunden Heißhaltezeit zu erwarten ist.

Bereits 1959 wies WODSAK (108) nach, daß bei einer Erhitzung auf 120°C etwa 30 bis 60 % des Gehaltes an Penicillin, Streptomycin und Aureomycin in der Milch zerstört werden.

Nach Angaben des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes (39) wird Penicillin bei Erhitzen auf

90°C über 30 Minuten zu 20 %, durch Sterilisieren oder Kochen zu 50 % zerstört, während Streptomycin und Neomycin bei einer Erhitzung auf 100°C über 30 Minuten 66 % und Chlortetracyclin und Tetracyclin sogar 90 % ihrer Aktivität verlieren. Dabei ist aber nicht eindeutig zu klären, ob die Antibiotika durch die Erhitzung zerstört werden oder durch andere Veränderungen nur ihre Wirksamkeit inaktiviert wird.

2.6. Die Bedeutung sonstiger Hemmstoffe in der Milch.

Bereits 1890 untersuchte FOKKER (65) die bakteriziden Eigenschaften roher Milch, indem er sterilisierte und rohe Milch mit Milchsäurebakterien beimpfte. Die sterilisierte Milch kam dabei schneller zur Gerinnung als frische, aseptisch ermolzene Milch. Er folgerte daraus, daß rohe Milch "zerstörende Eigenschaften" auf die überimpften Kulturen habe. Diese natürliche antibiotische Aktivität frisch ermolgener Milch wird in erster Linie den Lacteninen zugeschrieben (97), die sich aus einem Gemisch verschiedener Körper mit vermutlichem Eiweißcharakter zusammensetzen. Inzwischen konnten ASHTON und BUSTA (2) zeigen, daß die natürlichen Hemmstoffe der Milch an die Kaseinfraction gebunden sind und mit dem Proteingehalt der Milch ansteigen. Eine Abhängigkeit vom Laktationsstadium konnten sie nicht feststellen. Durch OVERBY (81) ist bekannt, daß Milch mit erhöhtem Keimgehalt eine natürliche Hemmwirkung aufweist, die durch bestimmte Bakterien verursacht wird. Streptococcus lactis bildet zum Beispiel Nisin, ein Stoffwechselprodukt von Proteinstruktur. Ein dem Nisin ähnlicher Hemmstoff, das Diplococcin, wird von Streptococcus cremoris gebildet (79).

SINELL (95) weist auf Untersuchungsergebnisse hin, nach denen bei 37°C die natürliche antibiotische Aktivität der Milch nach 2 bis 3 Stunden verschwindet, bei

4°C aber über 16 Stunden und im tiefgefrorenen Material tagelang vorhanden bleibt. Seinen Angaben zufolge ist bei mittleren Temperaturen die natürliche Aktivität nicht vor 8 Stunden nach dem Melken verschwunden, läßt sich aber bei vorher durch Erhitzen inaktivierter Milch durch 5 % Rohmilchzusatz reaktivieren.

Auch Hormone, Fermente, Leukozyten und Epithelien sollen einen hemmenden Einfluß auf Bakterien ausüben können (100). SEELEMANN und OBIGER (94) weisen auf hemmende Einflüsse durch die Fütterung, zum Beispiel Silage, hin.

Nach BRUNSCHWILER (15) kann im Agarlochtest der Hemmeffekt frischer Rohmilch einem Penicilliergehalt von 0,5 Einheiten pro ml Milch entsprechen.

Durch Versuche hatte MÄCK (65) ermittelt, daß bei einer Einsaat von 150 Bac. stearothersophilus var. calidolactis-Keimen pro ml Rohmilch nach 4 Stunden Bebrütungszeit bei 55°C noch 98 Keime pro ml nachzuweisen waren. Wurde die Milch aber auf 80°C für 5 Minuten erhitzt, so konnte er 425 Keime pro ml auszählen.

3. E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Material

3.1.1.1. Verwendete Kulturen

3.1.1.1.1. Joghurtkultur (Streptococcus thermophilus und Lactobacillus bulgaricus im Verhältnis 1:1, täglich frisch überimpft und auf Reinheit geprüft).

3.1.1.1.2. 3 Kulturen von Bacillus stearothersophilus var. calidolactis.^X

3.1.1.2. Milch

3.1.1.2.1. Vorzugsmilch aus dem Handel sowie Hemmstoff-freie Rohmilch einer Versuchskuh der Med.Vet.Klinik Gießen zum Ansatz für die Modellversuche.

3.1.1.2.2. 300 Bestandsmilchproben zur Bestimmung der Keim-inaktivierung.

3.1.1.2.3. 1.000 Bestandsmilchproben zur Hemmstoff-Feststellung.

3.1.1.3. Nährmedien

3.1.1.3.1. Chinablau-Lactose-Agar für die Bakteriologie (MERCK, Art. Nr. 2348).

3.1.1.3.2. Nährbouillon (1% Hefeextrakt, 2% Trypton, 0,05% Glucose; pH 8,0).

3.1.1.3.3. Schrägagar (Nutrient Agar OXOID, Code Nr. CM 3).

3.1.1.3.4. Brillantschwarz-Reduktionstest-Tabletts des Laboratoriums Enterotox mit Bac. stearothersophilus var. calidolactis als Testorganismus. Die Testtabletts wiesen 96 Vertiefungen auf, in denen sich der die Sporensuspension enthaltende Agar befand. Dem Agar war Brillantschwarz als Redoxindikator zugesetzt, das bei Wachstum von Bac. stearothersophilus var. calidolactis reduziert wurde. ^{XX}

^X Auch an dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. TOLLE, Kiel, Herrn Dr. KLEINSCHROTH, Kempten, und Herrn Prof. TERPIAN, Hannover, für die Übersendung der Kulturen danken.

^{XX} Das Brillantschwarz-Reduktionsmaterial wurde für Versuchszwecke vom Laboratorium Enterotox zur Verfügung gestellt, wofür der Firma verbindlichst gedankt sei.

- 3.1.1.3.5. Brillantschwarz-Reduktionstest-Nährböden, ausgegossen in Petrischalen mit Durchmesser 90 mm und 140 mm (hergestellt von der Firma Enterotox).
- 3.1.1.4. Indikatoren und Reagentien.
- 3.1.1.4.1. Methylenolau für medizinische Zwecke (MERCK, Art. Nr. 6040).
- 3.1.1.4.2. Kubel-Tiemans-Lackmuslösung für die Bakteriologie (MERCK, Art. Nr. 5314).
- 3.1.1.4.3. 2, 3, 5,-Triphenyltetrazoliumchlorid (=TTC) für die Bakteriologie (MERCK, Art. Nr. 8330).
- 3.1.1.4.4. Bacillus-cereus-Penicillinase (Neutrapen) (Kettelbach Rieker Pharma GmbH Borken/Westf.).
- 3.1.1.4.5. AMPUWA (steriles pyrogenfreies Aqua pro injectione; Dr. Fresenius KG, Bad Homburg).
- 3.1.1.4.6. Filterpapier-Blättchen (Antibiotic Assay Discs) mit einem Durchmesser von 13,0 mm .
- 3.1.1.5. Antibiotika
- 3.1.1.5.1. Penicillin "Göttingen" Penicillin G-Natrium Inj.-Flasche mit je 100.000 IE (Penicillin-Gesellschaft, Göttingen).
- 3.1.1.5.2. Streptomycin "Bayer" Inj.-Flasche mit je 1,25 g Streptomycinsulfat entspr. 1 g Base (Bayer Leverkusen).
- 3.1.1.5.3. Chloramphenicol Leukomycin pulv.subst. (Bayer Leverkusen)
- 3.1.1.5.4. Chlortetracyclin Aureomycin^R=Chlortetracyclin HCl-krist. Reinsubstanz (Lederle Arzneimittel München).
- 3.1.1.5.5. Oxytetracyclin Terramycin^R, 50 mg Testsubstanz entspr. 20 mg Oxytetracyclin (Pfizer GmbH Karlruhe).
- 3.1.1.5.6. Kanamycin Resistomycin^R, 1,4 g Kanamycinsulfat entspr. 1 g Resistomycin (Bayer Leverkusen).
- 3.1.1.5.7. Neomycin Bykomycin^R, 500 g Neomycinsulfat entspr. 330 mg Neomycinbase (Byk-Gulden GmbH Konstanz).

- 3.1.1.5.8. Spiramycin 1 g Spiramycin entspr. 1 g Selektomycin
(Chemie Grünenthal GmbH Stolberg/
Rheinland, Charge 1237)
- 3.1.1.5.9. Procain-Penicillin
renschler 1 ml Suspension mit je 300.000 IE
Procain-Penicillin G gebrauchsfertige,
wäßrige Lösung
(Dr. Renschler u.Co., Laubheim).
- 3.1.1.5.10. Prevethenat-compositum ad us. vet.
20 ml enthalten in öliger Suspension:
50.000 IE Penicillin-G-Natrium
200.000 IE Clemizol-Penicillin G
200.000 IE Dihydrostreptomycinsulfat
50.000 IE Dihydrostreptomycin-
pantothenat
2.000 mg Sulfisomidin
200 mg Chlormidazol-HCl
100 mg Lokalanästhetikum
(Chemie Grünenthal GmbH. Stolberg/
Rheinland)
- 3.1.1.5.11. Tardomyocel-L-Suspension ad us. vet.
100 ml enthalten in öliger Suspension:
2.500.000 IE N,N'-Dibenzylaethylendiamin-
di-Penicillin-G (Tardomyocel)
2.500 mg Chloramphenicol (Leukomycin)
2.500 mg 4-Aminobenzolsulfothio-
cabamid-Salz des 4-Amino-
methylbenzolsulfonamids
(Marbadol^R)
(Bayer Leverkusen)
- 3.1.1.5.12. Stapenor 5-Methyl-3-phenyl-4 isoxazolyl-
Penicillin-Natrium-Monohydrat
(Bayer Leverkusen).

3.1.2. Methoden.

3.1.2.1. Keimzahlbestimmung.

Die Keimzahlbestimmung der Milch wurde im Koch'schen Plattenverfahren unter Verwendung von Chinablau-Lactose-Agar in den Verdünnungsstufen 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} angesetzt. Als Verdünnungsflüssigkeit wurde eine sterile physiologische Kochsalzlösung (0,85 %) verwendet. Je Verdünnung wurden 2 Kulturen angesetzt, die für 48 Stunden bei 30°C bebrütet wurden. Als Keirgehalt wurde der Mittelwert aus der Anzahl der in einem Plattenpaar gewachsenen Kolonien angegeben, wobei jeweils die Verdünnungsstufen gewählt wurden, die zwischen 30 und 300 Kolonien aufwiesen.

Bei der Ermittlung der Keimzahlen erhitzter Milch wurde ebenfalls der Chinablau-Lactose-Agar, jedoch in den Verdünnungsstufen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} , angewendet.

3.1.2.2. Die Erhitzung der Milchproben zur Inaktivierung des Keimgehaltes.

Von jeder zu prüfenden Milchprobe wurden für jede vorgesehene Erhitzungstemperatur je 10 ml in fünf Reagenzgläser mit Durchmesser 16 mm abgefüllt. Während in ein Reagenzglas (Kontrolle) ein Thermometer verbracht wurde, wurden die übrigen vier Reagenzgläser mit sterilen Gummistopfen verschlossen. Jeweils ein Reagenzglas von jeder Milchprobe wurde im Wasserbad bei 85°C für 5 Minuten, bei 80°C für 5 Minuten, bei 66°C für 30 Minuten oder bei 60°C für 2 Stunden erhitzt. Die Erhitzungszeit, die mit einer Stoppuhr gemessen wurde, wurde ab dem Zeitpunkt gerechnet, an dem im Kontrollröhrchen die gewünschte Temperatur erreicht worden war. Unmittelbar nach der Erhitzung wurden die Proben unter fließendem Wasser auf Zimmertemperatur heruntergekühlt. Dann wurde der Keimgehalt ermittelt.

3.1.2.3. Die Anwendung des Methylenblau-Reduktionstestes zur Bestimmung der Wachstumsintensität von Joghurtkultur.

Von jeder Bestandsmilch wurden jeweils 10 ml in fünf sterile Reagenzröhrchen abgefüllt, die mit einem sterilen Gummistopfen verschlossen wurden. Jeweils ein Röhrchen jedes Ansatzes wurde auf 75°, 80°, 85°, 90° und 95°C für 5 Minuten im Wasserbad erhitzt und anschließend unter fließendem Wasser auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Aus 50 ml Joghurt und 100 ml aufgekochtem und auf 20°C abgekühltem Leitungswasser wurde eine Joghurt-Suspension hergestellt. Von dieser Joghurt-Suspension wurde 1 ml in jedes Röhrchen zugegeben. Gleichzeitig wurden 0,5 ml einer aus 5 ml Methylenblaulösung und 195 ml sterilem Aqua dest. angesetzten Lösung jedem Röhrchen zugefügt und gut gemischt.

Danach wurden die Röhrchen im Wasserbad bei 43°C bebrütet.

In Abständen von 5 Minuten wurden die Milchproben auf Entfärbung geprüft.

3.1.2.4. Hemmstoffproben

3.1.2.4.1. Joghurt-Test

Je 10 ml der zu untersuchenden Milchproben wurden in sterilisierte Reagenzgläser pipettiert und 5 Minuten bei 85°C im Wasserbad heißgehalten, danach auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit je 1 ml einer Mischung aus gleichen Teilen frischer Joghurtkultur und Kubel-Tiemans-Lackmuslösung mit einer Pipette beimpft. Die Reagenzröhrchen wurden mit sterilen Gummistopfen verschlossen und gründlich geschwenkt bis in allen Ansätzen ein gleichmäßiger blauer Farbton erreicht war. Bei jedem Versuch wurden eine Hemmstoff-freie und eine stark Hemmstoff-haltige Milchprobe als Kontrollen

angesetzt. Die Bebrütung erfolgte bei 43°C im Wasserbad für 2 Stunden. Danach wurde auf Gerinnung und Farbe geprüft.

Eine Probe wurde dann als Hemmstoff-positiv beurteilt, wenn innerhalb von 2 Stunden keine Gerinnung und kein Farbumschlag nach rot eingetreten war und wenn außerdem die Hemmstoff-freie Kontrolle vollständig geronnen war und einen Farbumschlag nach rot erkennen ließ.

3.1.2.4.2. TTC-Reduktionstest

Zur Vermehrung der Kultur wurde Bac. stearothermophilus var. calidolactis auf Schrägagarröhrchen ausgestrichen und 24 Stunden bei 55°C im Brutschrank bebrütet. Danach wurde die Kultur mit je 5 ml physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt. Zu 10 ml Bouillon, abgefüllt in Babyflaschen, wurden dann 0,5 ml der Bakterien-Suspension zugegeben. Nach guter Durchmischung wurde 6 Stunden bei einer Temperatur von 66°C im Wasserbad bebrütet. Die Babyflaschen wurden gelegentlich geschüttelt, um die Sauerstoffdiffusion in dem Nährsubstrat zu erhöhen. Für die so erhaltene Testkultur wurde ein Keimgehalt von $3,5 \times 10^7$ bis 4×10^7 Keimen / ml ermittelt.

Für den Hemmstoffnachweis wurden 10 ml der zu untersuchenden Milch in sterile Reagenzgläser abgefüllt und für 5 Minuten bei 85°C heißgehalten. Nach der Erhitzung wurde auf Bebrütungstemperatur heruntergekühlt und 0,6 ml der Testkultur zugegeben. Die beimpfte Milchprobe wurde 25 Minuten bei 66°C im Wasserbad bebrütet, dann wurden 0,5 ml einer wöchentlich frisch hergestellten 1 %igen TTC-Lösung zugegeben. Nach gutem Durchmischen wurde im Wasserbad für weitere 20 Minuten bebrütet. Als Kontrolle diente ein Röhrchen mit Hemmstoff-freier Milch. In Hemmstoff-freien Proben reduzierten die

Testkeime das farblose TTC zu rotem Formazan, was sich durch einen hellrosa bis roten Farbton der Milch zu erkennen gab. Trat nach Ablauf der Bebrütungszeit keine Farbänderung ein, d.h. TTC wurde nicht reduziert, so wurde die Probe Hemmstoff-positiv beurteilt.

Aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche mußte zur Erreichung eines ausreichenden Wachstums der Testkultur anstelle von 0,2 ml - wie von TERPLAN und ZAADHOF (100) angegeben - 0,6 ml Testkultur überimpft werden.

3.1.2.4.3. Agardiffusionstest.

a) Lochtest.

Dieser Test wurde mit von der Firma Laboratorium Enterotox hergestellten Testtablets, wie sie auch von der Firma im Handel angeboten werden, durchgeführt (siehe 3.1.1.3.4.). Die Tablets wurden bis zur Verwendung bei 2 bis 4°C gelagert.

Entsprechend der Gebrauchsanweisung wurde nach Ablösung der Klebefolie auf jedes Reaktionssystem jeweils mit einer sterilen Pipette 0,1 ml der zu prüfenden Milch gegeben. Das so präparierte Testtablett wurde unverschlossen zur Diffusion der Hemmstoff-Substanzen für 1 Stunde in den Kühlschrank gestellt. Danach wurde die Milch aus dem umgedrehten Tablett durch zweimaliges ruckartiges Auf- und Abbewegen des Tablets aus den Vertiefungen ausgeschwenkt. Anschließend wurde das Tablett zum Abtropfen auf ein saugfähiges Papier gedrückt und dann mit der Klebefolie wieder fest verschlossen. Die Bebrütung erfolgte im Brutschrank bei 68 bis 70°C für die Dauer von 2 Stunden. Zur Erreichung einer hohen Luftfeuchtigkeit wurde eine mit Wasser gefüllte Petrischale in den Brutschrank verbracht.

Die Reaktionen wurden an der Plattenunterseite abgelesen. In den Hemmstoff-positiven Proben blieb der blauviolette Farbton des Agars erhalten, während bei den Hemmstoff-negativen Proben der Farbstoff Brillantschwarz in die gelbe Reduktionsstufe überführt wurde.

b. Blättchen-Test.

Dieser Test wurde aus den von der Firma Laboratorium Enterotox zur Verfügung gestellten Nährböden (siehe 3.1.1.3.5.) durchgeführt, die bis zur Verwendung bei 2 - 4°C gelagert waren.

Mit einer Pinzette wurden die Filterpapier-Blättchen (siehe 3.1.1.4.6.) am Rand gehalten und in die zu untersuchende Milchprobe eingetaucht. Anschließend wurden die Blättchen auf die Nährbodenfläche gelegt und leicht mit der Pinzette angedrückt, wobei ein Auspressen der aufgesogenen Milch vermieden wurde. Danach wurden die Petrischalen bei 55°C im Brutschrank bebrütet und stündlich auf Hemmstoff-Bildung geprüft. Die im Nährboden verteilten Sporen des Bac. stearothermophilus wuchsen bei der Bebrütung und bildeten einen gleichmäßigen Rasen. Befanden sich in einer zu untersuchenden Milch Hemmstoffe, so konnte rund um das Blättchen eine Hemmzone wahrgenommen werden, die in Millimeter gemessen wurde, während bei Hemmstoff-freien Milchproben bis an die Blättchen Rasenwachstum von Bac. stearothermophilus beobachtet wurde. Das dem Nährboden als Redoxindikator zugesetzte Brillantschwarz ermöglichte durch Gelbverfärbung ein leichteres Erkennen der Hemmhöfe.

Auf einer Plastischale mit Durchmesser von 140 mm konnten 19 Blättchen aufgelegt werden, die fortlaufend numeriert wurden. Blättchen Nr. 1 wurde in Hemmstoff-freie Kontrollmilch getaucht, während jeweils Blättchen Nr. 10 mit einer 20.000 Einheiten pro ml

aufweisenden Penicillinase-Lösung getränkt wurde, um eine eventuelle Inaktivierung benachbarter Blättchen zu erreichen.

3.1.2.2. Der Nachweis von Tetracyclinen durch Fluoreszenz-optische Methoden.

Zu 10 ml Hemmstoff-freier, bei 85°C für 5 Minuten heißgehaltener und anschließend auf Zimmertemperatur abgekühlter Rohmilch wurden jeweils 20 mg Chlor-tetracyclin (Aureomycin), Oxytetracyclin (Terra-mycin) und Tetracyclin (Reverin) gegeben. Nach Lösung bzw. Vermischen der Substanzen wurde mit ebenfalls Hitze-inaktivierter Milch in Stufen bis zu einer Endkonzentration von 0,2 g/ml Milch verdünnt.

Für die makroskopische Fluoreszenz-optische Beurteilung wurden die Verdünnungsreihen mit einer Fluotest-Lampe (Universal "Original Hansa") auf Fluoreszenz geprüft.

Für die Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung wurde je ein Tropfen von jeder Verdünnungsstufe auf einen Objektträger pipettiert (1 ml - Pipette). Die Präparate wurden unter einem Großen Fluoreszenz-Mikroskop Carl Zeiss auf goldgelbe Fluoreszenz überprüft (Erregerfilter BG 12/4, Sperrfilter 44 und 50, Objektiv 6,3-, Okular 8-fach).

3.1.2.6. Die Inaktivierung von Penicillin mittels Penicillinase

Der Inhalt einer Ampulle Penicillinase mit 800.000 Levy-Einheiten wurde in 40 ml sterilem Aqua dest. aufgelöst, so daß 1 ml der Lösung 20.000 Levy-Einheiten Penicillinase enthielt. 100.000 IE Penicillin G-Natrium wurden in Hemmstofffreier Rohmilch so gelöst, daß 1 ml Rohmilch 20.000 IE Penicillin G-Natrium enthielt. Dann wurde die Milch-Penicillin-Lösung 5 Minuten auf 85°C erhitzt. In einem weiteren Ansatz wurde Hemmstoff-freie Milch bei 85°C für 5 Minuten erhitzt und nach dem Abkühlen mit Penicillin G-Natrium so versetzt, daß 1 ml Milch 20.000 IE Penicillin G-Natrium enthielt. Daraufhin wurden 20, 10, 2 und 1 ml Penicillinase-Lösung (20.000 E pro ml) zu 1 ml Penicillin-haltiger Milch - nach oder vor Penicillin-Zusatz erhitzt - gegeben. Durch diese Versuchsanordnung wurde erreicht, daß die Zahl der Penicillinase-Einheiten der einzelnen Ansätze entweder der Zahl der Penicillin-Einheiten entsprach oder das 2-, 10- oder 20-fache der Zahl der Penicillin-Einheiten betrug. Der Grad der Inaktivierung der einzelnen Ansätze wurde im Hemmstofftest mit dem Agardiffusionstest unter Verwendung von Enterotox-Testtablets durchgeführt.

Um zu ermitteln, ob Penicillinase auch die anderen verwendeten Antibiotika und Antibiotika-haltigen Mastitispräparate zu inaktivieren vermag, wurden die ermittelten Nachweis-Grenzkonzentrationen pro ml der einzelnen Substanzen jeweils in einfacher, vier-facher und acht-facher Konzentration hergestellt und im Verhältnis 1:1 mit der Penicillinaselösung (20.000 E/ml) vermischt und anschließend im Hemmstofftest - wie oben - geprüft.

Jeweils 1 ml von den im Hemmstofftest positiven Bestandsproben wurde mit 1 ml Penicillinase-Lösung vermischt und auf Enterotox-Testtablets auf Hemmwirkung geprüft.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Die Bedeutung der Milcherhitzung vor der Durchführung von Hemmstoffproben.

3.2.1.1. Reduktion des Keimgehaltes durch Vorerhitzung der Rohmilch.

Von 100 Bestandsmilchproben (Rohmilch) wurden jeweils eine Teilprobe auf 85°C und auf 80°C jeweils 5 Minuten erhitzt. Eine weitere Teilprobe blieb unerhitzt. Zusätzlich wurde von 50 der insgesamt 100 Proben eine Teilprobe auf 66°C für 30 Minuten und eine Teilprobe auf 60°C für 2 Stunden erhitzt.

Von allen erhitzten Proben, sowie von der jeweiligen nicht erhitzten Kontrollprobe wurde der Gesamtkeimgehalt im Koch'schen Plattenverfahren mit Chinablau-Lactose-Agar ermittelt.

Das arithmetische Mittel des Keimgehaltes der insgesamt 100 Rohmilchproben betrug 5.340.977 Keime pro ml, während das arithmetische Mittel für die 50 Rohmilchproben, von denen Teilproben auch auf 60°C und 66°C erhitzt wurden, 8.363.615 Keime pro ml betrug. Als niedrigster Keimgehalt wurden 108.000 Keime pro ml, als höchster 32.700.000 Keime pro ml Rohmilch ausgezählt.

Nach Erhitzung auf 85 bzw. 80°C für 5 Minuten konnten bei 100 Proben im Durchschnitt noch 19,5 bzw. 81 Keime pro ml Milch ermittelt werden, mit einem Schwankungsbereich zwischen 2 und 1.490 bzw. 8 und 2.640 Keimen pro ml. Als geometrischer Mittelwert wurden 27,0939 bzw. 100,5113 Keime pro ml ermittelt. Bei den auf 85°C erhitzten Milchproben war für den Keimgehalt die mittlere Abweichung vom geometrischen Mittelwert 23,87167.... 30,75116 und die Standardabweichung der Einzelwerte 7,63799....96,10929.

Nach einer Erhitzung auf 80° C konnte die mittlere Abweichung vom geometrischen Mittelwert des Keimgehaltes mit 85,66449....117,93129 und die Standardabweichung der Einzelwerte mit 20,32703....496,99963 errechnet werden.

Nach Erhitzung auf 66° C und einer Heißhaltezeit von 30 Minuten wiesen die 50 Milchproben einen durchschnittlichen Keimgehalt von 80.844 Keimen pro ml Milch und eine Schwankungsbreite zwischen 650 und 955.000 Keimen pro ml auf.

Der Mittelwert der Keimzahlen lag bei den 50 für 2 Stunden auf 60° C erhitzten Proben bei 65.002 Keimen pro ml, wobei als niedrigste Keimzahl 700 und als höchste 1.430.000 Keime pro ml Milch ermittelt wurden.

Tabelle 5: Die Reduzierung des Keimgehaltes durch die Vor-
erhitzung der Rohmilch (Keimzahlen bezogen auf ml).

	roh	55°C	60°C	65°C	70°C
Durchschnitt für 50 Proben	8.363.515	139	370	80.844	15.002
Durchschnitt für 100 Proben	5.340.977	81	334		
Schwankungs- bereich für 50 Proben	148.000 bis 32.700.000	5 bis 1.490	8 bis 2.640	450 bis 155.000	700 bis 1.430.000
Schwankungs- bereich für 100 Proben	108.000 bis 32.700.000	2 bis 1.490	8 bis 2.640		
Medianwert für 50 Proben	3.515.000	37	117	15.000	7.700
Medianwert für 100 Proben	1.865.000	19	81		
Geometri- scher Mittelwert für 100 Proben		27,0339	100,5113		
Mittlere Abweichung vom Mittel- wert für 100 Proben		23,87167 bis 30,75116	45,14422 bis 117,93129		
Standard- abweichung der Einzelwerte		7,63722 bis 96,10929	20,32703 bis 496,93953		
Abtötungs- quote für 50 Proben		8.363.476	8.363.245	8.292.770	8.298.613
Abtötungs- quote für 100 Proben		5.340.837	5.340.644		
Abtötungs- effekt für 50 Proben		99,9983%	99,9955%	99,0333%	99,2962%
Abtötungs- effekt für 100 Proben		99,998%	99,9937%		

3.2.1.2. Die Inaktivierung der Milch-eigenen Hemmstoffe.

3.2.1.2.1. Die Auswirkung des Zusatzes von erhitzter Milch zu Rohmilch auf das Wachstum von Joghurtkultur.

Zunächst wurde eine Reihe von Rohmilchproben im Verhältnis 10:1 mit Joghurt-Lackmus-Gemisch vermischt (Gesamtmenge 11 ml) und 120 Minuten bei 43°C im Wasserbad bebrütet.

Bei allen Ansätzen war weder eine Säuerung noch eine Gerinnung festzustellen.

Dann wurde Rohmilch mit unterschiedlichen Teilen derselben Ausgangsmilch, die jedoch vorher auf 85°C für 5 Minuten erhitzt worden war, verdünnt. Die Verdünnungsstufen können aus der Tabelle 6 ersehen werden.

Erst bei Zugabe von 2 ml erhitzter Milch zu 8 ml Rohmilch trat nach der Bebrütung eine Säuerung ein. Gerinnung konnte jedoch erst bei Zugabe von 3 ml erhitzter Milch zu 7 ml Rohmilch nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Der Einfluß des Zusatzes von erhitzter Milch zu Rohmilch für das Wachstum von Joghurtkultur.

Rohmilch in ml	Erhitzte Milch (85°C für 5 Min.) in ml	Säuerung	Gerinnung
10	0	-	-
9	1	-	-
8	2	+	-
7	3	+	+
6	4	+	+
5	5	+	+
4	6	+	+
3	7	+	+
2	8	+	+
1	9	+	+
0	10	+	+

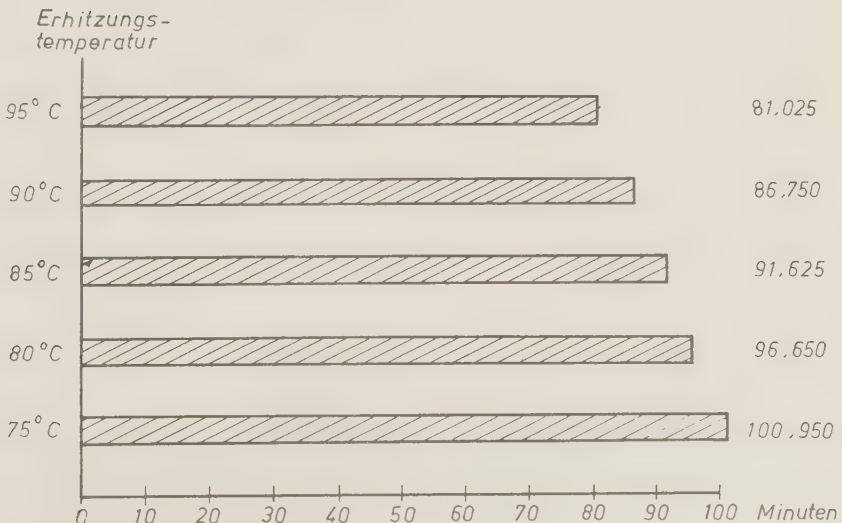
Bei vierfachem Ansatz der Versuche mit verschiedener Milch konnten die Ergebnisse reproduziert werden.

3.2.1.2.2. Die Bedeutung unterschiedlicher Vorerhitzung der Milch für die Vermehrung von Joghurtkultur.

Die Wachstumsintensität der Joghurtkultur wurde mittels des Methylenblau-Reduktionstestes bewertet. Für 200 Anlieferungsmilchen wurde nach einer Erhitzung auf 95°C , 90°C , 85°C , 80°C oder 75°C und einer Weißhaltezeit von 5 Minuten die durchschnittlichen Entfärbungszeiten im Methylenblau-Reduktionstest ermittelt.

Diese lagen zwischen 81,025 Minuten bei 95°C Erhitzung und 100,950 Minuten bei 75°C Erhitzung. Bei einer Erhitzung auf 90°C betrug die durchschnittliche Entfärbungszeit 86,750 Minuten, bei 85°C 91,625 Minuten und bei 80°C 96,650 Minuten.

Tabelle 7: Durchschnittliche Entfärbungszeiten von 200 Milchproben im Methylenblau-Reduktionstest nach verschiedenen Erhitzungstemperaturen.



Als Schwankungsbreiten für die einzelnen Entfärbungszeiten ergaben sich bei 95°C Werte zwischen 45 und 145 Minuten, bei 90°C Werte zwischen 45 und 155 Minuten und bei 85°C, 80°C und 75°C jeweils Werte zwischen 50 und 175 Minuten.

3.2.1.3. Besprechung der Ergebnisse

Die Beeinflussung des Gesamtkeimgehaltes und der Milch-eigenen Hemmstoffe in Rohmilch ist abhängig von der Höhe und der Dauer der Erhitzung. Eine Erhitzung auf 85°C bei 5 Minuten Heißhaltezeit führt zu einer Inaktivierung von 99,9937 % der im Durchschnitt in der Rohmilch vorhandenen Keime, während bei einer Erhitzung auf 66°C für 30 Minuten im Durchschnitt nur 99,0333 Keime pro ml Milch abgetötet werden. Das Ergebnis des Methylenblau-Reduktionstestes macht deutlich, daß auch eine möglichst hohe Erhitzung für die Inaktivierung der Milch-eigenen Hemmsubstanzen gegenüber Joghurtkultur notwendig ist.

Die Untersuchungsergebnisse bestätigen die Empfehlungen von FRANK (23,24), LIMMER (62,63), WITTER (107) und LERCHE (61), die vorschlagen, daß vor der Durchführung des Joghurttestes die Rohmilch auf 85°C für 5 Minuten erhitzt werden soll.

3.2.2. Ermittlung der Nachweisgrenzen für Antibiotika in Milch unter Verwendung verschiedener Nachweismethoden sowie der spezifische Nachweis von Antibiotika in Milch.

3.2.2.1. Nachweis für Antibiotika-Reinsubstanzen.

In frisch ermolzene Milch einer klinisch gesunden und unbehandelten Versuchskuh wurden Antibiotika-Reinsubstanzen bis zu Konzentrationen verdünnt, die jeweils unterhalb der aus der Literatur ersichtlichen Konzentrationen für die einzelnen Tests lagen. Dann wurde die Antibiotika-enthaltende Milch für 5 Minuten auf 85°C erhitzt und auf Zimmertemperatur gekühlt. Parallel zu diesen Versuchen wurde Milch derselben Versuchskuh auf 85°C für 5 Minuten erhitzt und anschließend jeweils die Antibiotika wie oben der abgekühlten Milch zugegeben.

Die Antibiotika-Ansätze wurden im Joghurt-Test, im TTC-Reduktionstest, im Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets und mit dem Blättchentest auf Hemmstoffgehalt geprüft.

Durch die Versuchsanordnung sollte ermittelt werden, ob Unterschiede in den Nachweisgrenzen bei Erhitzung und Nicht-Erhitzung der Antibiotika bestehen.

Bei der Ermittlung der Nachweis-Grenzkonzentrationen im Joghurt-Test (Säuerungsprobe mit Lackmus) wurde unterschieden zwischen einer negativen Konzentration, bei der die Probe vollständig dickgelegt und nach rot umgeschlagen war, und einer positiven Konzentration, bei der die Milch keinerlei Gerinnung zeigte und der ursprünglich blaue Farbton erhalten blieb. Da bei einer Anzahl von Proben kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte, d.h. die Proben zeigten zwar eine geringgradige Farbveränderung nach Rot und die Gerinnung war entweder nicht oder nur in Spuren eingetreten, mußte die Beurteilung "fraglich" eingeführt werden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Nachweisgrenzen für erhitzte und nichterhitzte Antibiotika im Joghurt-Test.

Antibiotikum	Antibiotikum		Ergebnisse		
	erhitzt	negativ(-) bis	fraglich(±) bis	positiv(+) ab	
Penicillin G	+	0,03 IE	0,04 IE	0,05 IE	
Natrium	-	0,02 IE	0,03 IE	0,04 IE	
Bykomycin	+	5 ♂	-	6	♂
	-	4 ♂	-	5	♂
Resistomycin	+	42 ♂	47 ♂	50	♂
	-	32 ♂	35 ♂	40	♂
Selektomycin	+	2,5 ♂	3 ♂	4	♂
	-	2 ♂	2,5 ♂	3	♂
Leukomycin	+	10 ♂	11 ♂	12	♂
	-	10 ♂	11 ♂	12	♂
Aureomycin	+	1,5 ♂	2,5 ♂	3	♂
	-	0,8 ♂	0,9 ♂	1	♂
Terramycin	+	0,4 ♂	0,6 ♂	0,7	♂
	-	0,3 ♂	0,6 ♂	0,7	♂
Streptomycin	+	30 ♂	35 ♂	40	♂
	-	25 ♂	35 ♂	40	♂

Beurteilung: (-) keine Hemmung = Milch gerötet und geronnen
 (±) unvollständige Hemmung = Milch violettrot bis rot,
 nicht oder nur in Spuren
 geronnen.
 (+) vollständige Hemmung = Milch blau bis blauviolett
 und flüssig

Im TTC-Reduktionstest mit Bac. stearothermophilus
var. calidolactis wurde geprüft, bis zu welcher
 Konzentration das jeweilige Antibiotikum in der
 Lage ist, die Reduktion des farblosen Formazan
 zu hemmen (Tabelle 9). Beim TTC-Test war es
 auch nicht möglich, nur nach den beiden Beurtei-

lungsstufen "positiv" und "negativ" die Ergebnisse einzuteilen. Es mußte auch hier die Beurteilungsstufe "fraglich" eingeführt werden.

Tabelle 9: Nachweisgrenzen für erhitzte und nicht erhitzte Antibiotika im TTC-Test.

Antibiotikum	Antibiotikum		Ergebnisse		
	erhitzt	negativ(-) bis	fraglich(±) bis	positiv(+) ab	
Penicillin G	+	0,006 IE	-	0,007 IE	
Natrium	-	0,006 IE	-	0,007 IE	
Bykomycin	+	4 ♂	5 ♂	6	♂
	-	4 ♂	-	5	♂
Resistomycin	+	5 ♂	7 ♂	8	♂
	-	2 ♂	-	3	♂
Selektomycin	+	15 ♂	20 ♂	25	♂
	-	10 ♂	20 ♂	25	♂
Leukomycin	+	12 ♂	-	13	♂
	-	11 ♂	-	12	♂
Aureomycin	+	0,4 ♂	1 ♂	1,2	♂
	-	0,3 ♂	0,8 ♂	0,9	♂
Terramycin	+	1,1 ♂	-	1,2	♂
	-	0,9 ♂	-	1	♂
Streptomycin	+	2 ♂	-	2,5	♂
	-	1,5 ♂	-	1,6	♂

Beurteilung: (-) keine Hemmung = Milch wird rosa bis rot
 (±) unvollständige Hemmung = Milch wird hellrosa
 (+) vollständige Hemmung = Milch bleibt weiß

Die Prüfungen mit Gem von der Firma Enterotox präparierten Testtablets wurden in doppeltem Ansatz durchgeführt. Die Ergebnisse der Parallelproben stimmten bis auf einen Versuch überein. Bei der Wiederholung des Versuchs ergab sich dann Übereinstimmung.

Bei einem Teil der Proben ergab sich weder eine vollkommene Reduzierung des Brillantschwarz nach Gelb, noch war der ursprüngliche Farbton erhalten geblieben. Die Reaktionen, die sich durch eine Hellblau-Verfärbung des Nährmediums zu erkennen gaben, wurden als fraglich beurteilt (Tabelle 10).

Tabelle 10: Nachweisgrenzen von Antibiotika im Agardiffusions-test mit Enterotox-Testtablets.

Antibiotikum	Antibiotikum		Ergebnisse		
	erhitzt	negativ(-) bis	fraglich(±) bis	positiv(+) ab	
Penicillin G	+	0,004 IE	-	0,005 IE	
Natrium	-	0,003 IE	-	0,004 IE	
Bykomycin	+	3 ♂	5 ♂	6 ♂	
	-	2,5 ♂	4 ♂	5 ♂	
Resistomycin	+	22 ♂	40 ♂	42 ♂	
	-	12 ♂	32 ♂	35 ♂	
Selektomycin	+	3 ♂	5 ♂	6 ♂	
	-	2,5 ♂	5 ♂	6 ♂	
Leukomycin	+	1,8 ♂	1,9 ♂	2 ♂	
	-	1,7 ♂	1,9 ♂	2 ♂	
Aureomycin	+	0,8 ♂	0,9 ♂	1 ♂	
	-	0,8 ♂	0,9 ♂	1 ♂	
Terramycin	+	4 ♂	7 ♂	8 ♂	
	-	1,5 ♂	2 ♂	3 ♂	
Streptomycin	+	5 ♂	-	10 ♂	
	-	1 ♂	5 ♂	10 ♂	

Beurteilung: (-) keine Hemmung

= Reaktionssystem wird nach Gelb reduziert

(±) unvollständige Hemmung

= Reaktionssystem wird hellblau

(+) vollständige Hemmung

= Reaktionssystem wird nicht reduziert und bleibt blau

Der Blättchentest wurde mit allen geprüften Antibiotika-Substanzen unter Verwendung von Nährboden mit pH 6,6, denen Brillantschwarz als Redoxindikator zugesetzt worden war, durchgeführt. Die Ergebnisse konnten nach 6 bis 8 Stunden Bebrütungszeit beurteilt werden (Tabelle 11). Die Beurteilung der Ergebnisse erfolgte nach dem Durchmesser des Hemmhofes, wobei erst ab einem deutlichen Hemmhof von 1,5 mm die Beurteilung "positiv" gewählt wurde.

Tabelle 11: Nachweisgrenzen von Antibiotika im Agardiffusionstest mit Testblättchen.

Antibiotikum	Antibiotikum		Ergebnisse			
	erhitzt	negativ(-) bis	fraglich(±) bis	positiv(+) ab		
Penicillin G	+	0,008 IE	-	0,009 IE		
Natrium	-	0,007 IE	0,008 IE	0,009 IE		
Bykomycin	+	5	20	22	8	8
	-	1	20	22	8	8
Resistomycin	+	20	35	40	8	8
	-	20	35	40	8	8
Selektomycin	+	5	22	24	8	8
	-	5	20	22	8	8
Leukomycin	+	25	-	30	8	8
	-	25	-	30	8	8
Aureomycin	+	11	13	14	8	8
	-	8	9	10	8	8
Terramycin	+	2	3	4	8	8
	-	2	2,5	3	8	8
Streptomycin	+	25	30	35	8	8
	-	25	30	35	8	8

Beurteilung: (-) keine Hemmung = kein Hemmhof um Blättchen
 (±) unvollständige Hemmung = Hemmhof um Blättchen weniger als 1,5 mm
 (+) vollständige Hemmung = deutlicher Hemmhof von mindestens 1,5 mm Breite

3.2.2.2. Nachweis von einigen gebräuchlichen Antibiotika-haltigen Mastitispräparaten.

Die Mastitispräparate wurden wie bei den Versuchen mit den Reinsubstanzen stufenmäßig mit der Milch verdünnt. Ausgangskonzentration war jeweils 1 ml des Präparates. Die erzielten Grenzwerte sind in ml des Präparates angegeben. Eine Umrechnung auf Einheiten der Wirksubstanz war nur bei Procain-Penicillin möglich. Hier sind die Grenzwerte in IE angegeben.

Tabelle 12: Nachweisgrenzen der Mastitispräparate im Joghurt-Test.

Präparat	Präparat	Ergebnisse		
	erhitzt	negativ(-) bis	fraglich(±) bis	positiv(+) ab
TL-Suspension	+	3,6.10 ⁻⁶ ml	-	4,0.10 ⁻⁶ ml
	-	3,6.10 ⁻⁶ ml	-	4,0.10 ⁻⁶ ml
Procain-Penicillin	+	0,04 IE	0,05 IE	0,07 IE
	-	0,04 IE	0,05 IE	0,06 IE
Prevethenat	+	7,0.10 ⁻⁶ ml	8,0.10 ⁻⁶ ml	9,0.10 ⁻⁶ ml
	-	7,0.10 ⁻⁶ ml	-	8,0.10 ⁻⁶ ml
Stapenor	+	6,0.10 ⁻⁶ ml	-	7,0.10 ⁻⁶ ml
	-	5,0.10 ⁻⁶ ml	-	6,0.10 ⁻⁶ ml

Tabelle 13: Nachweisgrenzen der Mastitispräparate im TTC-Test

Präparat	Präparat	Ergebnisse		
	erhitzt	negativ(-) bis	fraglich(±) bis	positiv(+) ab
TL-Suspension	+	2,8.10 ⁻⁶ ml	3,2.10 ⁻⁶ ml	3,6.10 ⁻⁶ ml
	-	2,4.10 ⁻⁶ ml	2,8.10 ⁻⁶ ml	3,2.10 ⁻⁶ ml
Procain-Penicillin	+	0,006 IE	0,007 IE	0,008 IE
	-	0,004 IE	-	0,005 IE
Prevethenat	+	5,0.10 ⁻⁶ ml	5,0.10 ⁻⁶ ml	6,0.10 ⁻⁶ ml
	-	4,0.10 ⁻⁶ ml	5,0.10 ⁻⁶ ml	6,0.10 ⁻⁶ ml
Stapenor	+	1,5.10 ⁻⁶ ml	-	2,0.10 ⁻⁶ ml
	-	1,0.10 ⁻⁶ ml	-	1,5.10 ⁻⁶ ml

Tabelle 14: Nachweisgrenzen der Mastitispräparate im Agar-diffusionstest mit Enterotox-Testtablets.

Präparat	Präparat		Ergebnisse	
	erhitzt	negativ(-) bis	fraglich(±) bis	positiv(+) ab
TL-Suspension	+	$2,8 \cdot 10^{-6}$ ml	$3,2 \cdot 10^{-6}$ ml	$3,6 \cdot 10^{-6}$ ml
	-	$3,2 \cdot 10^{-6}$ ml	$3,6 \cdot 10^{-6}$ ml	$4,0 \cdot 10^{-6}$ ml
Procain-Penicillin	+	0,001 IE	0,002 IE	0,003 IE
	-	0,0009 IE	0,001 IE	0,002 IE
Prevethenat	+	$1,5 \cdot 10^{-6}$ ml	$2,5 \cdot 10^{-6}$ ml	$3,0 \cdot 10^{-6}$ ml
	-	$1,5 \cdot 10^{-6}$ ml	$2,0 \cdot 10^{-6}$ ml	$2,5 \cdot 10^{-6}$ ml
Stapenor	+	$1,5 \cdot 10^{-6}$ ml	$5,0 \cdot 10^{-6}$ ml	$6,0 \cdot 10^{-6}$ ml
	-	$1,0 \cdot 10^{-6}$ ml	$5,0 \cdot 10^{-6}$ ml	$6,0 \cdot 10^{-6}$ ml

Tabelle 15: Nachweisgrenzen der Mastitispräparate im Agar-diffusionstest mit Testblättchen.

Präparat	Präparat		Ergebnisse	
	erhitzt	negativ(-) bis	fraglich(±) bis	positiv (+) ab
TL-Suspension	+	$2,8 \cdot 10^{-6}$ ml	$3,6 \cdot 10^{-6}$ ml	$4 \cdot 10^{-6}$ ml
	-	$2,4 \cdot 10^{-6}$ ml	$2,8 \cdot 10^{-6}$ ml	$3,2 \cdot 10^{-6}$ ml
Procain-Penicillin	+	0,008 IE	0,009 IE	0,01 IE
	-	0,008 IE	0,009 IE	0,01 IE
Prevethenat	+	$1 \cdot 10^{-6}$ ml	$3 \cdot 10^{-6}$ ml	$4 \cdot 10^{-6}$ ml
	-	$1 \cdot 10^{-6}$ ml	-	$2 \cdot 10^{-6}$ ml
Stapenor	+	$2 \cdot 10^{-6}$ ml	$3 \cdot 10^{-6}$ ml	$4 \cdot 10^{-6}$ ml
	-	$2 \cdot 10^{-6}$ ml	$3 \cdot 10^{-6}$ ml	$4 \cdot 10^{-6}$ ml

Die in den Tabellen 8 bis 15 angegebenen Nachweisgrenz-Konzentrationen für Antibiotika und Antibiotikahaltige Mastitispräparate wurden in der Tabelle 16 gegenübergestellt. Dabei wurden nur die im Joghurt-Test, im TTC-Test, im Agardiffusions-Test mit Enterotox-Testtablets und mit Testblättchen ermittelten

Konzentrationen aufgeführt, bei denen eindeutig positive Ergebnisse ermittelt worden waren (Tabelle 16).

Tabelle 16: Gegenüberstellung der Nachweisgrenzen von Antibiotika und Antibiotika-haltigen Mastitispräparaten (Angaben bezogen auf Internationale Einheiten (IE) bzw. Gamma (γ) pro ml Milch).

	Joghurt- Test	TTC- Test	Enterotox- Test	Blättchen- Test
Penicillin				
erhitzt	0,05 IE	0,007 IE	0,005 IE	0,009 IE
nicht erhitzt	0,04 IE	0,007 IE	0,004 IE	0,009 IE
Bykomycin (Neomycin)				
erhitzt	6	6	6	22
nicht erhitzt	5	5	5	22
Resistomycin (Kanamycin)				
erhitzt	50	8	42	40
nicht erhitzt	40	3	35	40
Spiramycin (Spiramycin)				
erhitzt	4	25	6	24
nicht erhitzt	3	25	6	22
Chloramphenicol				
erhitzt	12	12	2	30
nicht erhitzt	12	12	2	30

Fortsetzung von Tabelle 16:

	Joghurt- Test	TTC- Test	Enterotoy- Test	Blättchen- Test
Aureomycin (Chlortetracyclin)				
erhitzt	3	1,2	1	14
nicht erhitzt	1	0,9	1	10
Terramycin (Oxytetracyclin)				
erhitzt	0,7	1,2	8	4
nicht erhitzt	0,7	1	3	3
Streptomycin				
erhitzt	40	2,5	10	35
nicht erhitzt	40	1,6	10	35
Tardomyocel-L- Suspension				
erhitzt	4	3,6	3,6	4
nicht erhitzt	4	3,2	4	3,2
Procain- Penicillin				
erhitzt	0,07 IE	0,008 IE	0,003 IE	0,01 IE
nicht erhitzt	0,06 IE	0,005 IE	0,002 IE	0,01 IE
Prevethenat				
erhitzt	9	6	3	4
nicht erhitzt	8	6	2,5	2
Stapenor (Oxacyllin)				
erhitzt	7	2	6	4
nicht erhitzt	6	1,5	6	4

3.2.2.3. Spezifischer Nachweis von Antibiotika und Antibiotika-haltigen Mastitispräparaten.

3.2.2.3.1. Der Nachweis von Tetracyclinen mittels Fluoreszenz-optischer Methoden.

Bei der makroskopischen Fluoreszenz-optischen Überprüfung konnten bei Chlortetracyclin bis zu 4 γ /ml, bei Oxytetracyclin bis 4 γ /ml und bei Tetracyclin bis 3 γ /ml eindeutig durch goldgelbe Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Bei der Fluoreszenz-mikroskopischen Methode lagen die Nachweisgrenzen für Chlortetracyclin bei 0,8 γ /ml, für Oxytetracyclin bei 0,9 γ /ml und für Tetracyclin bei 1,0 γ /ml.

3.2.2.3.2. Der Nachweis von Penicillin mittels Penicillinase.

Je ein ml der frisch hergestellten Verdünnungen Penicillin-G-Natrium-haltiger Milch in den Konzentrationen von 20.000 IE, 10.000 IE, 5.000 IE und 1.000 IE Penicillin G pro ml Milch wurden jeweils mit ein ml Penicillinase-Lösung (20.000 Levy-Einheiten) vermischt und im Agardiffusionstest auf Hemmstoffwirkung geprüft. Der 20.000 Einheiten Penicillin-G-Natrium enthaltende Ansatz führte zu einer fraglichen, die übrigen Verdünnungen zu einer eindeutig negativen Reaktion. Von den übrigen verwendeten Antibiotika und Antibiotika-haltigen Mastitispräparaten wurden die Verdünnungen in der ein-, zwei-, vier- und acht-fachen Nachweis-Grenzkonzentration hergestellt und mit ein ml Penicillinase-Lösung vermischt und im Agardiffusionstest auf Enterotox-Testtablets geprüft. Hierbei ergab sich, daß außer Penicillin und Procain-Penicillin auch die Penicillin-haltigen Präparate Prevethenat und Tardomyocel-L-Suspension in allen Konzentrationen durch Penicillinase inaktiviert wurden, d.h. der Hemmstofftest fiel negativ aus. Stapenor wurde nur in der einfachen Nachweis-Grenzkonzentration (6 γ /ml) inaktiviert.

Nach einer dem Versuch vorausgehenden Erhitzung der Antibiotika-haltigen Milchproben auf 85°C bei 5 Minuten Heißhaltezeit und anschließendem Vermischen mit Penicillinase-Lösung (20.000 E pro ml) im Verhältnis 1:1 wurden mit Ausnahme von Stapenor bei den erhitzten Antibiotika-haltigen Mastitispräparaten dieselben Ergebnisse wie bei den nicht-erhitzten erzielt. Erhitztes Stapenor wurde im Gegensatz zu nicht erhitztem nicht nur in der einfachen, sondern auch in der zwei-, vier- und achtfachen Grenzkonzentration inaktiviert.

3.2.2.4. Besprechung der Ergebnisse.

Die niedrigsten Nachweisgrenzen für Antibiotika-Reinsubstanzen wurden beim Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets bei Penicillin, Leukomycin und Aureomycin erzielt. Für Bykomycin erwiesen sich der Joghurt-Test, der TTC-Test und der Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets als gleichwertig. Die Nachweisgrenzen für Penicilline lagen im Joghurt-Test etwa eine Dezimale höher als im Enterotox-Test, während im TTC-Test die Nachweisgrenzen etwa doppelt so hoch waren als im Enterotox-Test. Auffallend ist, daß sich Resistomycin mit dem Enterotox-Test und dem Joghurt-Test nur in hohen Konzentrationen nachweisen ließ, während der Nachweis von Selektomycin im Joghurt-Test, aber auch im Enterotox-Test auch bei niedrigen Konzentrationen gelang.

Im Blättchentest lagen die Nachweisgrenzen bei den Reinsubstanzen fast durchweg erheblich über den Nachweisgrenzen, die bei Anwendung der anderen Tests erzielt wurden. Der Joghurt-Test war lediglich bei Resistomycin und Streptomycin weniger empfindlich als der Blättchentest.

Die Unterschiede der Nachweisgrenzen bei Anwendung des TTC-Testes gegenüber dem Enterotox-Test bei Resistomycin, Selektomycin, Leukomycin und Terramycin können dadurch erklärt werden, daß für die Entero-

tox-Testtablets eine andere Kultur von Bac. stearothermophilus var. calidolactis verwendet worden ist als beim TTC-Test.

Die für den TTC-Test verwendete Kultur ist gegenüber Spiramycin und Leukomycin wenig, gegenüber Kanamycin, Oxytetracyclin und Streptomycin gut empfindlich.

Die für die Enterotox-Testtablets verwendete Kultur weist eine verminderte Sensibilität gegenüber Resistomycin, Terramycin und Streptomycin auf.

Bei der Prüfung der Mastitis-Präparate ergab sich, daß der Blättchentest nur bei Stapenor empfindlicher reagierte als der Enterotox-Test oder die beiden anderen Teste. Mit dem Enterotox-Test ließ sich Prevethenat in geringerer Konzentration als mit dem TTC-Test erfassen, während der TTC-Test besonders empfindlich gegenüber Stapenor reagierte.

Beim Vergleich der ermittelten Nachweisgrenzen für erhitzte und nicht erhitzte Antibiotika ergab sich, daß alle Antibiotika teilweise inaktiviert wurden, was sich in einer Verschiebung der Nachweisgrenzen ausdrückte. Allerdings war der Grad der Inaktivierung gering.

Die Feststellung, daß Stapenor nach Erhitzung durch Penicillinase weitgehend inaktiviert werden kann, läßt vermuten, daß die Penicillinase-Stabilität von Stapenor durch Hitze beeinflusst wird.

Die Fluoreszenz-optischen Methoden sind für die differentialdiagnostische Bestimmung von Tetracyclinen geeignet. Bei der makroskopischen Methode liegen die Nachweisgrenzen über der Empfindlichkeit der mikrobiologischen Methode.

Bei Anwendung der Penicillinase-Probe ist die Identifizierung von Penicillin bzw. Penicillin-haltigen Präparaten möglich. Bei Vorerhitzung der

Milch kann auch das Penicillinase-stabile Oxa-
cillin mit Penicillinase spezifisch nachgewiesen
werden.

3.2.3. Die Erprobung der Nachweismethoden unter Praxis- bedingungen an Bestandsmilchproben.

3.2.3.1. Allgemeiner Hemmstoffnachweis

Insgesamt wurden 1.000 Bestandsmilchproben im
Joghurt-Test und im Agardiffusionstest mit Enter-
tox-Testtablets und mit Testblättchen auf Hemm-
stoff-Gehalt untersucht. Die Milchproben wurden
für den Joghurt- und den Blättchen-Test immer auf
85°C für 5 Minuten erhitzt. Der Agardiffusionstest
mit Enterotox-Testtablets wurde sowohl mit der
erhitzten wie auch mit der unerhitzten Milch an-
gesetzt. Alle Proben wurden makroskopisch fluores-
zenz-optisch untersucht.

Hemmstoffe wurden bei den 1.000 Bestandsmilchproben
nachgewiesen:

im Joghurt-Test	bei 7 Proben = 0,7 %
im Enterotox-Test erhitzt	bei 10 Proben = 1,0 %
im Enterotox-Test unerhitzt	bei 10 Proben = 1,0 %
im Blättchen-Test	bei 3 Proben = 0,3 %
im makroskop. Fluoreszenztest	bei 2 Proben = 0,2 %

Die 3 im Blättchen-Test positiven Milchproben waren
auch im Joghurt-Test positiv. Die 7 im Joghurt-Test
positiven Proben und 3 weitere Proben zeigten im
Agardiffusionstest - erhitzt sowie unerhitzt - mit
Enterotox-Testtablets Hemmwirkung (Tabelle 17).
Nur zwei Proben (Probe Nr. 3 und Nr. 9) zeigten gold-
gelbe Fluoreszenz.

Tabelle 17: Das Verhalten der im Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets positiven Proben im Fluoreszenz-, im Joghurt- und im Blättchen-Test.

Positive Probe	Fluoreszenz-Test (makrosk.)	Joghurt-Test	Blättchen-Test
1	-	-	-
2	-	-	-
3	+	+	+
4	-	-	-
5	-	+	+
6	-	+	-
7	-	+	-
8	-	+	-
9	+	+	+
10	-	+	-

Alle im Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets positiven Proben wurden bei -30°C eingefroren und dann nach Abschluß aller Untersuchungen in Verdünnungsreihen (Aqua dest.) bis 1:1000 nochmals dem Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets unterzogen.

Hierbei zeigte sich, daß bei Probe 3 in der Verdünnung 1:1000 noch eine eindeutige Hemmung vorhanden war, während die Probe 9 bei der Verdünnung 1:1000 als eindeutig positiv beurteilt werden konnte. Die Probe 5 reagierte in der Verdünnung 1:1 und 1:2 fraglich.(Tabelle 18)

Im Blättchentest wies die Probe 3 einen Hemmhof von 19 mm, die Probe 9 einen Hemmhof von 22 mm und die Probe 5 einen Hemmhof von 4 mm auf, während das in Milch mit 1 IE Penicillin pro ml getränkte Kontroll-Blättchen einen Hemmhof von 9 mm zeigte (Tabelle 18).

Tabelle 18: Hemmwirkung der positiven Proben im Enterotox-
Test nach Verdünnung mit Aqua dest.

Positive Probe	Verdünnung mit Aqua dest.						
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:10	1:100	1:1000
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	-	-	-
5	±	±	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-

3.2.3.2. Spezifischer Nachweis

3.2.3.2.1. Der Nachweis von Tetracyclin mittels Fluoreszenz- Mikroskopie.

Die Milchproben 3 und 9 und in geringem Umfange auch die Probe 8 zeigten goldgelbe Fluoreszenz.

3.2.3.2.2. Der Nachweis von Penicillin mittels Penicillinase.

Von den nach dem Einfrieren noch positiven Proben wurden ein ml mit ein ml Penicillinase-Lösung (20.000 Einheiten pro ml) mit Enterotox - Test-Tabletts auf Hemmwirkung geprüft.

Bei der Probe 5 wurde Bac. stearothermophilus var. calidolactis nicht im Wachstum gehemmt, während bei den Proben 3 und 9 nach wie vor eine Hemmung festzustellen war.

3.2.3.3. Besprechung der Ergebnisse

Die Feststellungen, daß mit den Enterotox-Testtablets in 10 Proben, im Joghurt-Test in 7 Proben und im Blättchen-Test in 3 Proben Hemmstoffe nachgewiesen wurden, sprechen dafür, daß der Enterotox-Test die empfindlichste und der Blättchen-Test die unempfindlichste Methode darstellt. Da die Ergebnisse im Enterotox-Test bei erhitzter und unerhitzter Milch identisch waren, kann geschlossen werden, daß eine Vor-erhitzung vor Ansetzen des Enterotox-Testes entbehrlich ist.

Ob alle im Enterotox-Test und Joghurt-Test positiven Milchproben Antibiotika enthielten, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da nach dem Auftauen in sieben Proben keine Hemmstoffe nachzuweisen waren und somit eine Abklärung dieser Proben mit Penicillinase nicht mehr möglich war. Aus der Feststellung, daß die Hemmaktivität der Probe 5 durch Penicillinase vollständig inaktiviert werden konnte, kann geschlossen werden, daß in dieser Probe Penicillin enthalten war. Für die Proben 3 und 9 läßt sich aussagen, daß die Proben ein Tetracyclin-Präparat enthielten, da beide Proben makroskopisch und mikroskopisch deutlich goldgelbe Fluoreszenz zu erkennen gaben. Der Tetracyclinegehalt der Proben 3 und 9 lag relativ hoch, da die Proben bei der Verdünnung 1:1000 bzw. 1:100 noch eindeutig eine Hemmung auf Enterotox-Testtablets erkennen ließen, was auf einen entsprechenden Gehalt an Tetracyclinen von mindestens 1000 bzw. 100 μ /ml schließen läßt. Auch für Probe 8 kann angenommen werden, daß die Probe Tetracycline in geringer Menge enthielt, da auch in dieser Probe mikroskopisch goldgelbe Fluoreszenz festzustellen war. Als Erklärung dafür, daß sieben der ursprünglich positiven Proben nach dem Erhitzen im Hemmstofftest nicht positiv reagierten, kann in Betracht gezogen werden, daß während der Gefrierlagerung eine Inaktivierung etwa vorhandener Antibiotika oder anderer Hemmstoffe eingetreten war.

3.3. Zusammenfassende Besprechung der Ergebnisse und Schlußbetrachtung.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen erkennen, daß der Joghurt-Test, der TTC-Reduktionstest und der Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets und mit Testblättchen nicht nur zur Erfassung von Penicillinen, sondern auch für die anderen in der Mastitis-Therapie eingesetzten Präparate geeignet sind. Allerdings liegt die Empfindlichkeit der Methoden für die Erfassung von Penicillinen wesentlich höher als für die übrigen Antibiotika.

Die empfindlichste Methode für die meisten Antibiotika stellt der Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets dar. Jedoch sprechen einzelne Antibiotika - wie Spiramycin und Oxytetracyclin - auf den Joghurt-Test und Resistomycin und Stapenor auf den TTC-Reduktionstest empfindlicher an. Die Unterschiede der Nachweisgrenzen sind jedoch für diese Substanzen gering. Der Agardiffusionstest mit Testblättchen ist bis auf Stapenor durchweg weniger empfindlich als der Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets.

Unterschiede in der Empfindlichkeit des TTC-Reduktionstestes gegenüber dem Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets lassen vermuten, daß durch die Verwendung verschiedener Kulturen von Bac. stearothermophilus var. calidolactis eine unterschiedliche Erfassungsbreite möglich ist. Dies macht es notwendig, daß die Kulturen, die zur Herstellung von Testtablets dienen, einer ständigen Kontrolle auf ihre Sensibilität gegenüber den gebräuchlichen, bei der Therapie von Milchtieren verwendeten Antibiotika unterworfen werden müssen. Sofern die Untersuchungsstellen die Testtablets von einer zentralen Stelle beziehen, können Schwierigkeiten, die mit der unterschiedlichen Sensibilität der Kulturen zusammenhängen, vermieden werden. Dadurch wird eine Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse an verschiedenen Stellen ermöglicht.

Der Joghurt-Test sowie der TTC-Reduktionstest sind für Routine-Untersuchungen wegen ihrer arbeitsaufwendigen Technik nicht zu empfehlen. Der arbeitstechnisch einfache Blättchentest kann wegen seiner relativ geringen Empfindlichkeit und seinem großen Materialbedarf für die routinemäßige Anwendung nur bedingt empfohlen werden.

Ein weiterer Vorteil für den Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets gegenüber dem Blättchentest muß auch in der kurzen Reaktionszeit gesehen werden. Die Ergebnisse des Agardiffusionstestes mit Enterotox-Testtablets liegen bereits nach 3 Stunden vor, während für den Blättchentest eine Bebrütungszeit von 6 bis 8 Stunden benötigt wird.

Der Vorteil des Joghurt-Testes liegt darin, daß er mit betriebseigenen Mitteln in jeder Molkerei durchgeführt werden kann. Da jedoch Antibiotika-haltige Milch oft in starker Verdünnung, insbesondere bei der modernen technisierten Milchanlieferung zu den Molkereien gelangt, muß gefordert werden, daß die empfindlichste Methode zumindest als Suchprobe eingesetzt wird. Bei gezielten Kannenmilch-Untersuchungen könnte auf den Joghurt-Test zurückgegriffen werden.

Durch die Anwendung der beschriebenen Fluoreszenz-optischen Prüfung auf Tetracycline und der ebenfalls beschriebenen Penicillinase-Probe ist eine Identifizierung von Penicillinen und Tetracyclinen möglich. Diese Identifizierung ist unter Praxisbedingungen immer dann von besonderem Interesse, wenn aus einer positiven Hemmstoff-Probe auf die verbotenerweise erfolgte Anlieferung der Milch von Kühen, die mit Antibiotika behandelt worden sind, geschlossen werden soll. Hierbei empfiehlt sich jedoch, die Probe vor dem nochmaligen Ansatz zur Penicillinase-Prüfung zu erhitzen, um auch das Penicillinase-stabile Staphenol (Oxacillin) zu erkennen.

Da die Empfindlichkeit der makroskopischen Fluoreszenz-optischen Methode für den Nachweis von Tetracyclin noch durchaus im Bereich der üblichen Ausscheidungsmengen, dieser Antibiotika liegt, kann diese Methode auch als Vorprobe empfohlen werden. Dafür spricht auch, daß nach den Angaben von BAUMGARTNER und MÜLLER (5) und BLOBEL (12) sowie eigener Untersuchungsergebnisse Tetracycline in Mengen über die Milch ausgeschieden werden, die wesentlich höher sind, als die Ausscheidungs-Konzentrationen anderer Antibiotika. Durch die Anwendung des Fluoreszenz-optischen Verfahrens ist eine sehr frühzeitige Erfassung von Tetracyclinen in Molkereien möglich. Dadurch könnte eine solche Milch bereits vor der Be- oder Verarbeitung erkannt werden.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen kann für die Erfassung von Antibiotika in Molkereien, milchwirtschaftlichen Untersuchungsstellen und Veterinär-Untersuchungsämtern folgendes Verfahren vorgeschlagen werden:

1. Makroskopische Vorprüfung der zu untersuchenden Milchproben auf für Tetracycline typische Fluoreszenz.
2. Durchführung des Agardiffusionstestes mit Enterotox-Testtablets.
3. Abklärung aller bei der Untersuchung nach 2.) Hemmstoffverdächtigen Proben durch die Fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung sowie durch die Penicillinase-Probe.

Während die unter 1.) und 2.) angeführten Untersuchungen in den Molkereien bzw. milchwirtschaftlichen Untersu-

chungsstellen durchgeführt werden könnten, sollten die Abklärungs-Untersuchungen den Veterinär-Untersuchungsämtern vorbehalten bleiben. Wenn die Abklärungs-Untersuchungen in amtlichen Untersuchungsstellen durchgeführt würden, würde die Beweiskraft der Untersuchungen in Streitfällen erhärtet sein.

Da die Sensibilität von Bac. stearothermophilus var. calidolactis gegenüber einzelnen Antibiotika variabel erscheint, und da die Herstellung der Testtablets in Routine-Untersuchungsanstalten mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden ist, sollten die Untersuchungsstellen die Testtablets von einer zentralen Stelle beziehen können. Dadurch würde die Reproduzierbarkeit der Untersuchungsergebnisse, die an verschiedenen Stellen erhoben werden, möglich sein. Allerdings sollten die Hersteller von Testtablets die Sensibilität laufend überwachen und diese nicht nur an Penicillin, sondern auch an anderen, bei der Behandlung von Milchkühen eingesetzten Präparaten orientieren.

Sollte die Durchführung von Hemmstoff-Proben im Rahmen rechtlicher Bestimmungen vorgeschrieben werden, dann sollte dem Agardiffusionstest nach KRAAK und TOLLE (57) der Vorzug gegeben werden. Die Test-Reaktionssysteme sollten nur bestimmten Stellen überlassen und von neutralen Stellen laufend überprüft werden.

Bei der Überprüfung des vorgeschlagenen Verfahrens an 1.000 Bestandmilchproben konnte die Brauchbarkeit des Verfahrens bestätigt werden. Allerdings sollten nicht - wie bei den vorliegenden Untersuchungen aus arbeitstechnischen Gründen notwendig - die Hemmstoff-positiven Proben vor Ansetzen der Penicillinase-Probe eingefroren werden.

Die Feststellung, daß 1 % der untersuchten Proben Hemmstoffe enthielten, ist Hinweis für die Notwendigkeit von laufenden Hemmstoffproben, um den Verbraucher und auch die Milchwirtschaft vor Schaden durch Antibiotika-haltige Milch zu bewahren.

3.4. Zusammenfassung

- a. Im Joghurt-Test, im TTC-Schnelltest, im Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets und mit Testblättchen wurden die Nachweis-Grenzkonzentrationen für folgende der Milch zugesetzte Antibiotika (Reinstoffen und Antibiotika-haltige Mastitispräparate) ermittelt: Penicillin, Streptomycin, Neomycin, Kanamycin, Chloramphenicol, Chlortetracyclin, Oxytetracyclin, Spiramycin, Procain-Penicillin, Prevethenat, Tardomyocel-L-Suspension und Stapenor.
- b. Verfahren zum makroskopischen und mikroskopischen Nachweis von Tetracyclinen über ihre Fluoreszenz wurden erprobt und vorgeschlagen.
- c. Zum spezifischen Nachweis von Penicillin wurde eine Methode unter Verwendung von Penicillinase erprobt und vorgeschlagen.
- d. 1.000 Bestandsmilchproben wurden auf Hemmstoffe untersucht. Zehn Proben (= 1,0 %) waren im Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets Hemmstoff-positiv. Von diesen reagierten nur sieben Proben im Joghurt-Test und drei Proben im Agardiffusionstest mit Testblättchen positiv.

Fluoreszenzmikroskopisch konnte erkannt werden, daß bei drei der positiven Proben die Hemmung auf Tetracycline zurückzuführen war, während bei einer Probe durch die Penicillinase-Probe Penicillin als Hemmstoff ermittelt wurde.

- e. Der Agardiffusionstest unter Verwendung von Bac. stearothermophilus var. calidolactis als Testkeim und Brillantschwarz als Redoxindikator wird als die Methode der Wahl für die Untersuchung von Milchproben auf Antibiotika empfohlen.

Zur Abklärung wird die Fluoreszenz-optische Untersuchung und der Penicillinase-Test vorgeschlagen.

4. Literaturverzeichnis

1. ASHTON, T.R. (1964):
Zur Durchführung von Antibiotika-Tests in englischen
Molkereien.
Molk.-Ztg. Welt der Milch 18, 969
2. ASHTON, D.H., BUSTA, F.F. (1968):
Milk components inhibitory to B. stearothermophilus.
J.Dairy Sci. 51, 842
3. AUTERHOFF, H. (1971):
Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie, 6. Auflage
Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart
4. BAUER, F., KLATT, P. (1966):
Galtimycin "blau" - ein farbstoffhaltiges Mastitis-
präparat.
Milchwiss. 21, 677
5. BAUMGARTNER, H., MÜLLER, E. (1966):
Der Antibiotikumsgehalt der Milch nach einer parentera-
len Behandlung des Milchtieres.
XVII. Intern. Milchwirtschaftskongr. A, 435
6. BAUMGARTNER, H. (1969):
Der Einfluß der Antibiotika auf die Milchqualität.
Welt der Milch 23, 651
7. BECK, G. (1964):
Inwieweit wird in der Frischmilch das Vorhandensein
von Antibiotika, Pflanzenschutz-, Schädlingsbekämpfungs-
und Vorratsschutzmitteln kontrolliert?
Molk.- u. Käs.- Ztg. 15, 1810
8. BECKER, W. (1966):
Zerstörung von Antibiotika in der Milch durch Kurz-
zeiterhitzung.
Milchwiss. 21, 155

9. BENTZ, H. (1970):
Wirkung und Anwendung von Sulfonamiden und Antibiotika
sowie ihre für die landwirtschaftliche Praxis und
menschliche Ernährung wichtigen Nebenwirkungen und
toxischen Eigenschaften.
Mh.Vet.Med. 25, 788
10. BISPING, W. (1962):
Die Kehrseite der Antibiotika-Therapie aus der Sicht
der Veterinärmedizin.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 69, 495
11. BLOBEL, H., BURCH, C.W. (1960):
Concentrations of penicillin in milk of cows following
intramuskular administration.
J. Amer. Vet. Med. Ass. 136, 477
12. BLOBEL, H. (1960):
Concentrations of Penicillin in Milk Secretions and
Blood Serums of Cows - Following Intramammary Infusion
of One or More Quarters.
J. Amer. Vet. Med. Ass. 137, 110
13. BREHM, G. (1966):
Diagnostik der Intoleranzen gegenüber Penicillin und
anderen Antibiotika.
Med. Klinik 61, 1180
14. BROWN, D.C., ROLLINS, W.L., PURKO, M. (1961):
Antibiotics in milk: concentrations and persistence
after parenteral administration.
Veterin. Med. 56, 58
15. BRUNSCHWILER, F. (1961):
Die Ausscheidungsdauer verschiedener Antibiotika bei
intramammärer Behandlung des Rindes.
Vet. Med. Diss. Bern
16. BUNDESANSTALT FÜR MILCHFORSCHUNG (1969):
Die hygienische Wertigkeit der Rohmilch und Empfehlungen
zu ihrer weiteren Verbesserung.
Kieler Milchwirtschaftl. Forschungsber. Bd. 21, 201

17. CANNON, R.Y., HAWKINS, G.E., WIGGINS, A.M. (1962):
Duration of secretion of bacteriostatic drugs in milk.
I. Penicillin, following oral and parenteral administration.
J. Dairy Sci. 45, 769
18. DIERNHOFER, K. (1955):
Epithel- und andere Gewebsschranken in der Chemotherapie.
Wien. tierärztl. Mschr. 42, 775
19. DRAGON, G. (1958):
Ein Beitrag zur Ermittlung von Hemmstoffen in der
Trinkmilch mittels Tetrazoliumsalz als Indikator und
die Möglichkeit ihrer weiteren Differenzierung mit Hilfe
des Kluver-Gärungstests.
Milchwiss. 13, 304
20. FEAGAN, J.T. (1966):
The detection of antibiotics residues in milk.
Dairy Sci. Abstr. 28, 53
21. FILIPP, G. (1968):
Häufigkeit und Quelle der Penicillinallergie
Med. Welt 19, 2763
22. FLEISCHMANN, K. (1954):
Läßt sich Penicillin in der Milch nachweisen?
Dtsch. Molk.-Ztg. 75, 534
23. FRANK, H. (1963):
Antibiotikakontrolle und Möglichkeiten zur Vermeidung
von Schäden im Betrieb.
Molk.- u. Käs.- Ztg. 14, 1453
24. FRANK, H. (1965):
Nachweis von Hemmstoffen in Milch und Milchpulver
Milchwiss. 20, 361
25. FRIMMER, M. (1969):
Pharmakologie und Toxikologie
F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart - New York

26. GALESLLOT, Th. E., HASSING, F. (1962):
Een snelle en gevoelige methode om met papierschijfjes
penicilline in melk aan te tonen.
Ned. Melk- en Zuiveltijdschrift 16, 89
27. GOUNELLE, H. (1968):
Le point de vue du médecin en face du problème posé par
les antibiotiques en l'alimentation animale.
Schweiz. Arch. Tierheilkunde 110, 52
28. GROSSKLAUS, D., LEVETZOW, R. (1966):
Ein Beitrag zur Standardisierung des Hemmstoffnachweises
in Milch und Milcherzeugnissen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 79, 128
29. GROSSKLAUS, D. (1967):
Antibiotikarückstände in der Trinkmilch.
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 74, 462
30. GROSSKLAUS, D. (1970):
Rückstandsprobleme vom Nutztier bis zum Lebensmittel.
Festvortrag. 13. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebens-
mittelhygiene in Saarbrücken.
31. GROVE, D. C. (1959):
Prevention of antibiotics in milk. - Present status.
J. Dairy Sci. 42, 199
32. HARGROVE, R.R., PLOWMAN, R.D., WHRIGHT, W.W. (1959):
Use of mackers in veterinary preparations for the detection
of antibiotics in milk.
J. Dairy Sci. 42, 202
33. HAUKE, H. (1968):
Untersuchungen über die Inaktivierung antibiotikahaltiger
Milch durch die Pasteurisierung.
Mh. Vet. Med. 23, 105
34. HEIDELMANN, G. (1959):
Nebenwirkungen der Antibiotika
Z. ärztl. Fortbild. 63, 57

35. HEIDRICH, H.J., RENK, W. (1963):
Krankheiten der Milchdrüse bei Haustieren.
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg
36. HOBBERGER, A. (1965):
Fremdstoffe in der Milch
Milchwirtschaftl. Ber. 5, 41
37. HOBBERGER, A. (1966):
Die hygienische Euterbehandlung unter besonderer Berücksichtigung farbstoffmarkierter Eutermedikamente.
Dtsch. Molk.-Ztg. 87, 1677
38. HOLEC, J. (1969):
Futterantibiotika und Lebensmittelhygiene.
Internat. Z. Landwirtschaft. Sofia/Berlin Nr. 3, 339
39. INTERNATIONALER MILCHWIRTSCHAFTSVERBAND (1967):
Methods for the detection of antibiotics in milk and milk products.
Milchwiss. 22, 529
40. JEPSEN, A. (1962):
WHO Geneva Monograph. Series 48, 449
(zitiert nach BAUMGARTNER, H., MÜLLER, E. (1966))
41. JORGENSEN, K.L. (1964):
Penicillinbekymringer
Medlemsbl. danske Dylaegeforen 47, 635
42. KAEMMERER, K. (1967):
Die Bedeutung der Arzneimittel für die Veterinärmedizin
Dtsch. Tierärztebl. 15, Sonderteil, 8
43. KAMPELMACHER, E.H. (1964):
Antibiotica in voeding van mens en dier.
Tijdschr. Diergeneeskunde 89, 1923
44. KANDLER, O. (1962):
Nachweis von Hemmstoffen in der Milch, einschließlich Reinigungs- und Desinfektionsmitteln.
Molk.- u. Käserei-Ztg. 13, 42

45. KANDLER, O., FRANK, H. (1962):
Vergleichende Untersuchung über die Hemmwirkung handels-
üblicher Mastitispräparate gegenüber verschiedenen Säure-
weckern und Testorganismen.
XVI. Inter. Dairy Congr. C, 535
46. KÄSTLI, P. (1963):
Milchkunde und Milchhygiene
II. Teil: Milchfehler
Buchverlag Verbandsdruckerei AG, Bern
47. KELLERMANN, R., WAUSCHKÜHN, B. (1968):
Nachweis von Hemmstoffen in der Anlieferungsmilch
Molk.-Ztg. Welt der Milch 22, 839
48. KEWITZ, H. (1967):
Tierärztliche Verantwortung bei der Anwendung von Arznei-
mitteln.
Dtsch. Tierärztebl. 15, Sonderteil, 21
49. KEWITZ, H. (1969):
Antibiotika in der Tierernährung
Dtsch. Tierärztebl. 17, 341
50. KNOTHE, H. (1963):
Langfristige nutritive Anwendung von Antibiotika in der Tier-
ernährung im Hinblick auf die menschliche Gesundheit, mit
besonderer Berücksichtigung von Chlortetracyclin.
Münch. med. Wschr. 105, 173
51. KNOTHE, H. (1967):
Antibiotische Stoffe in der Tierhaltung und mögliche Rück-
wirkungen auf den Menschen im Hinblick auf Allergie und
Bakterienresistenz.
Dtsch. Tierärztebl. 15, Sonderteil, 26
52. KÖPKE, G. (1965):
Nachweis der Antibiotika in der Milch
Vet. Med. Diss. Berlin (Humboldt-U.)
53. KOSIKOWSKI, F.V., HENNINGSON, R.W., SILVERMAN, G.J. (1952):
The incidence of antibiotics, sulfa drugs and quarternary
ammonium compounds in the fluid milk supply of new york state.
J.Dairy Sci. 35, 533

54. KOTTER, L., TERPLAN, G., SCHULZ, H. (1959):
Biologischer Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln
tierischer Herkunft.
Arch. Lebensmittelhyg. 10, 145
55. KOTTER, L. (1961):
Mißbräuchliche Anwendung von Hemmstoffen in Milch und Fleisch.
Arch. Lebensmittelhyg. 12, 100
56. KRAAK, J., TOLLE, A. (1967):
Brillantschwarz-Reduktionstest mit Bac. stearothermophilus
var. calidolactis zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch.
Milchwiss. 22, 669
57. KRAAK, J., TOLLE, A. (1969):
Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillantschwarz-
Reduktionstest.
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145
58. KRÜGER, K.-E. (1965):
Untersuchungen über die Möglichkeit einer Verfälschung von
Rohmilch durch Zusatz von Desinfektionsmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 16, 156
59. KUPKE, F. (1920):
Beiträge zur neueren Geschichte der Ätiologie und Therapie
der Euterentzündung des Rindes.
Vet. Med. Diss. Leipzig
(zit. nach HEIDRICH, HJ., RENK, W. (1963))
60. LANG, K. (1967):
Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Hemmstoffen in
der Milch.
Milchwiss. 22, 230
61. LERCHE, M. (1966):
Lehrbuch der tierärztlichen Milchüberwachung
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
62. LIMMER, H.-D. (1968):
Hemmstoffe in der Milch. - Erfahrungsbericht
Molk.- u. Käserei-Ztg. 19, 1604

63. LIMMER, H.-D. (1969):
Hemmstoffe in der Milch
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 227
64. LISKA, B.J. (1960):
A direct microscopic method for detection antibiotic activity
in milk.
J. Milk Food Tech. 23, 117
65. MÄCK, K. (1969):
Zum Hemmstoffnachweis in Milch unter Verwendung von Joghurt-
Säuerungsverfahren und von Brillantschwarzreduktionstesten
mit Bac. stearotherophilus var. calidolactis.
Vet. Med. Diss. Hannover
66. MAYR, A. (1969):
Antibiotikaallergien beim Tier
Prakt. Tierarzt 50, 264
67. MIETH, K., WILKE, I. (1965):
Die Ausscheidungsdauer verschiedener antibiotikahaltiger
Mastitispräparate durch die Milch.
Mh. Vet. Med. 20, 361
68. MIETH, K., WILKE, I. (1966):
Antibiotikanachweis in Kuhmilch nach parenteraler Verabreichung
Mh. Vet. Med. 21, 952
69. MOL, H. (1968):
Het voorkomen van antibiotica-residuen in aan de zuivelfabriek
afgeleverde melk.
Tijdschr. Diergeneeskunde 93, 579
70. MOL, H., BAKKER-DE KOFF, E.C. (1968):
Het voorkomen van antibiotica-residuen in de melk van intra-
mammar met penicilline/dihydrostreptomycine behandelde
melkkoeien.
Tijdschr. Diergeneeskunde 93, 584
71. MOREL, P. (1962):
Sur la présence d'antibiotiques dans le lait de trois zones
de production.
Lait 42, 593

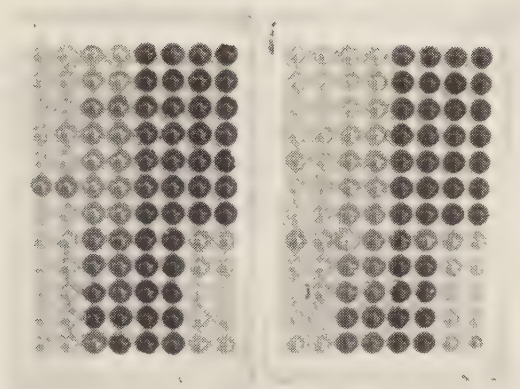
72. MÜNCH, S., ENKELMANN, D., PRINZ, I. (1970):
Zur Erkennbarkeit künstlich verfälschter Reduktionsproben.
Milchwiss. 25, 468
73. MYERS, R.P. (1964):
Antibiotic residues in milk.
Residue reviews 7, 9
74. NEAL, C.E., CALBERT, H.E. (1955):
The use of 2, 3, 5,- triphenyltetrazoliumchloride as a test
for antibiotic substances in milk.
J.Dairy Sci. 38, 629
75. N.N. (1931):
1. Verordnung zur Ausführung des Milchgesetzes vom 15. Mai 1931
Reichsgesetzblatt I., 150
76. N.N. (1961):
Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz)
vom 16. Mai 1961
Bundesgesetzblatt I, 533
77. N.N. (1964):
Gesichtspunkte der öffentlichen Hygiene beim Gebrauch von
Antibiotika in Lebens- und Futtermitteln.
Bericht einer Sachverständigen-Kommission der WHO Genf
Mh. Vet. Med. 19, 198
78. N.N. (1970):
Gesundheitsbericht der Bundesrepublik Deutschland vom
18. Dezember 1970
79. OBIGER, G. (1963):
Hemmstoffe in der Anlieferungsmilch und Methoden zu ihrem
Nachweis.
Arch. Lebensmittelhyg. 14, 10
80. OBIGER, G. (1970):
Das Problem der Fremd- und Wirkstoffe in Rohmilch sowie ihrer
Ermittlung. - Betrachtung zum Hemmstoffnachweis mit dem
Brillantschwarz-Reduktionstest.
Arch. Lebensmittelhyg. 21, 208

81. OVERBY, A.J. (1954):
Antibiotics in milk
Dairy Sci. Abstr. 16, 2
82. PICHNARCIK, J., WENZEL, S., GISSKE, W. (1961):
Beitrag zur Methodik des Hemmstoffnachweises in Organen
und Muskulatur von Schlachttieren.
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 272
83. RACKOW, H.G., WELZ, W. (1962):
Der Hemmstoffnachweis im Rahmen der Vorzugsmilchüberwachung.
Arch. Lebensmittelhyg. 13, 206
84. RACKOW, H.G., WELZ, W. (1964):
Weitere Ergebnisse und Erfahrungen mit einem Hemmstofftest
bei Milchuntersuchungen.
Arch. Lebensmittelhyg. 15, 49
85. REHM, W.F. (1961):
Zur Frage der Hemmstoffe in der Milch
Molk.-Ztg. Welt der Milch 15, 448
86. ROSENBERGER, G. (1970):
Krankheiten des Rindes
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg
87. SCHIPPER, I.A. (1967):
Die Chemotherapie der Mastitis
Vet. Med. Nachrichten 6, 264
88. SCHMID, A. (1969):
Zur Pharmakologie und Toxikologie der Antibiotika.
Prakt. Tierarzt 50, 503
89. SCHMIDT, O.C. (1962):
Untersuchungen über den Nachweis von Antibiotika in der Milch.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 75, 228
90. SCHOTHORST, M.VAN, PEELEN-KNOL, G. (1970):
Detection and identification of some antibiotics in slaughter
animals.
Neth.J.Vet.Sci., vol. 3, 85
91. SCHONHERR, W. (1960):
Vorschläge zur Standardisierung der tierärztlichen Milchunter-
suchung in Deutschland.
Milchwiss. 15, 16

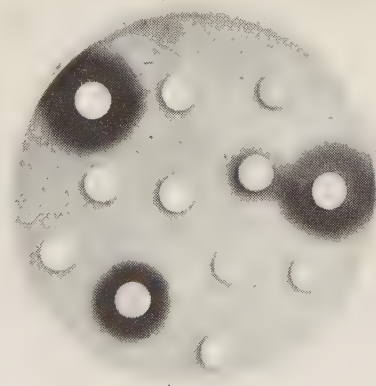
92. SCHÖNHERR, W. (1967):
Tierärztliche Milchhygiene
S. Hirzel Verlag, Leipzig
93. SEELEMAN, M., WEGENER, K.H. (1957):
Beeinflussung der Reaktionen zum Erhitzungsnachweis
der Milch durch Desinfektionsmittel.
Dtsch. Molk.-Ztg. 78, 417
94. SEELEMAN, M., OBIGER, G. (1965):
Die Antibiotika und die aus ihrer Anwendung für die Milch-
wirtschaft sich ergebenden Probleme.
Milchwiss. 18, 462
95. SINELL, H.-J. (1964):
Einige neuere Probleme bei der tierärztlichen Milchunter-
suchung.
Tierärztl. Umschau 19, 42
96. SINELL, H.-J. (1967):
Auswirkungen der Arzneianwendung auf die Lebensmittel- und
Milchhygiene.
Dtsch. Tierärztebl. 15 Sonderteil, 30
97. STORGARDS, T. (1962):
Nachweis von Penicillin und anderen Antibiotika in Milch.
Milchwiss. 17, 369
98. STORRS, F.C., HIETT-BROWN, W. (1954):
The incidence of penicillin in milk supplies.
J. Dairy Res. 21, 337
99. STURM, W. (1955):
Zum biologischen und chemischen Nachweis einiger Antibiotika.
Dtsch. Molk.-Ztg. 76, 832
100. TERPLAN, G., ZAADHOF, K.-J. (1967):
Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der Milch -
eine kurze Übersicht.
Milchwiss. 22, 761
101. TERPLAN, G., ZAADHOF, K.-J. (1969):
Der Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit Bac. stearothermo-
philus var. calidolactis im Agardiffusionstest und TTC-
Schnelltest.
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 279

102. TIEWS, J. (1967):
Zur Frage von Rückstandstoleranzen in Lebensmitteln tierischer Herkunft.
Tierärztl. Umschau 22, 428
103. WALTER, A.M., HEILMEYER, L. (1969):
Antibiotika-Fibel, 3. Auflage
Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart
104. WATROUS, G.H., JOSEPHSEN, D.V., DOAN, F.J., ELLIOT, D.R. (1962):
Problems in the routine detection of antibiotics in milk.
XVI. Int. Dairy Congr. C, 521
105. WELZ, W. (1961):
Beitrag zur Methodik biologischer Hemmstoffteste in Milch.
Arch. Lebensmittelhyg. 12, 196
106. WENZEL, S. (1970):
Hemmstofftest und Antibiotika-Rückstände im Fleisch schlachtbarer Haustiere.
Vortrag; 13. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der DVG in Saarbrücken.
107. WITTER, L.D. (1962):
Méthodes de l'épreuve du disque pour déceler la pénicilline dans le lait.
Lait 42, 21
108. WODSAK, W. (1955):
Bedeutung und Nachweis der Antibiotika in der Milch.
Die Nahrung 3, 729
109. WRIGHT, W.W., HAROLD, L.C. (1960):
Antibiotic residues in milk after parenteral and oral administration in cows.
J. Amer. vet.med. Ass. 137, 525
110. WHO-REPORT (1971):
Toxikologie der Milch und Milchprodukte.
Tierärztl. Umschau 26, 128
111. OGAA, J.S. (1970):
Intravitale Fluorochromierung der Milch mit Tetrazyklinen im Hinblick auf die Mastitisdiagnose.
Vet.Med.Diss. Gießen 1970

5. A n h a n g



Prüfung von Verdünnungsstufen eines Antibiotikums im Agardiffusionstest mit Enterotox-Testtablets zur Ermittlung der Nachweisgrenze (Antibiotikum links unerhitzt, rechts erhitzt).



Der Agardiffusionstest mit Testblättchen und Brillentschwarz als Indikator mit positiven und negativen Proben.

Am 1. Juni 1941 wurde ich als viertes Kind des Lehrers Friedrich Brunn und seiner Ehefrau Else geb. Wunderlich in Mainz geboren. Mein Vater starb 1945 in der Kriegsgefangenschaft.

Nach der Volksschule besuchte ich das altsprachliche Rhabanus-Maurus-Gymnasium in Mainz und bestand dort im März 1962 das Abitur.

Ab Sommersemester 1962 studierte ich Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen und legte dort die Tierärztlichen Vorprüfungen ab. Im Sommersemester 1965 war ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin immatrikuliert und im Wintersemester 1965/66 an der Tierärztlichen Hochschule in Wien.

Ab Sommersemester 1966 studierte ich wieder an der Freien Universität Berlin und bestand am 4. April 1968 die Tierärztliche Prüfung in Berlin.

Nach meiner Veterinär-Praktikantenzeit erhielt ich am 1. November 1968 die Approbation als Tierarzt. Nach kurzer Tätigkeit in der Praxis und am Schlachthof bin ich seit 1. April 1969 als Verwalter einer wissenschaftlichen Assistentenstelle im Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde, Abteilung Hygiene der Milch, Fische und Eier, tätig.

Herrn Professor Dr. H. Bartels möchte ich für die Überlassung des Themas und seine Anregungen danken.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Professor Dr. K. Lang für die stets freundliche Unterstützung und das Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. G. Kielwein fühle ich mich für die Übernahme dieser Arbeit, seine Anregungen zu besonderen Fragestellungen, seine rege Anteilnahme und seine jederzeit gewährte Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt auch dem technischen Assistenten, Herrn J. Weissner, für seine fleißige Mitarbeit.

